République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE YAHIA FARES de Médéa

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

MEMOIRE DE MASTER

En vue d'obtention du diplôme de master en génie des procédés pharmaceutique

Thème

Caractérisation physico-chimique et évaluation biologique de l'huile de *Nigella sativa L.*

Proposé et dirigé par :

Dr. TERKMANE Naila

Présentées par :

BOUKELKAL Nada

AMARI Imane

Soutenue le 17/09/2020, devant le jury composé de :

Dr. Benkiar Amina	MCB	Présidente
Dr. Youcef Ettoumi Khadidja	MCB	Examinatrice
Dr. Terkmane Naila	MCB	Promotrice

2019-2020

Remerciement

*Tout d'abord nous tiendrons à remercier **dieu** le tout puissant, pour nous avoir donné la force, la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*Mes plus vifs remerciements s'adressent vont à notre promotrice **Dr. TERKMANE N**, pour son aide, sa patience, sa disponibilité, et sa compréhensibilité.*

Nos remerciements vont particulièrement au président et membres de jury qui nous font l'honneur de juger ce travail.

Nous sommes très reconnaissantes envers les ingénieurs de laboratoire du hall technologie de l'université YAHIA Fares – Médéa.

Ainsi tous les travailleurs de l'Etablissement Publique de Santé de Proximité (DSP, laboratoire d'hygiène), qui nos ont accueillies au sein de leur laboratoire, où ce travail a été effectué, nous ont avoir facilité nos travaux et mettre à notre disposition les moyens nécessaires.

A tous les enseignants de la faculté de technologie et surtout les enseignants du département de Génie des Procédés et Environnement.

En fin, nous remercions, de tout cœur, tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Merci ***Allah*** *de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.*

Je dédie ce modeste travail aux être les plus chers : ***Mes parents,***

A mon père,

pour ses encouragements incessants et son soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite.

A ma mère,

pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égale dans les moments les plus difficiles de ma vie.

A tous les membres de ma famille, petite et grande.

Ainsi mon binôme IMEN

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen et du secondaire et de l'enseignement supérieur.

A toutes mes amies.

A tous la promotion génie des procédés pharmaceutiques.

BOUKELKAL Nada

Dédicace

Je remercie tout d'abord mon dieu le tout puissant qui m'a donné la volonté, la force et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Je dédie ce mémoire
À mes parents ma mère et mon père
Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

À mon frère : MOUHAMED.

À ma belle-sœur : WISSAME.

À ma sœurs : Nesrine son mari Khaled et son fils Mouhamed.

Ainsi mon binôme NADA.

À mes camarades

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

A tous mes cousins et cousines, voisins et voisines, amis et amies.

A toute ma promotion de l'année ***2019/2020****.*

AMARI Imen

ملخص

شهد استخلاص الزيوت النباتية من النباتات الطبية و العطرية رواجا كبيرا في الآونة الأخيرة و ذلك لاحتوائها على مكونات كيميائية التي بدورها تدخل في صناعة الأدوية و المكملات الغذائية و مستحضرات التجميل.

نهتم في هذه الرسالة بدراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية والنشاط المضاد للميكروبات لزيت الحبة السوداء، والذي تم الحصول عليه بالضغط الأولي على البارد من الحبة السوداء من منطقة سوريا. أظهر التوصيف الفيزيائي-الكيميائي كثافة 0.920 ، معامل انكسار 1.4720 ، مؤشر الحموضة 19.074 مغ KOH / غ HV ومؤشر التصبن 214.863 مغ KOH / غ HV. أظهر تقييم النشاط المضاد للبكتيريا حساسية للمكورات العنقودية الذهبية(*Staphylococus aureus*) والعقدية الانحلامية بيتا (*Streptocoque beta hémolitique*) بأقطار تثبيط 17 و 24 على التوالي

الكلمات المفتاحية: الزيت النباتي ، الحبة السوداء المزروعة ، الاستخلاص ، الفعالية المضادة للبكتيريا.

.

Résumé

L'extraction des huiles végétales des plantes médicinales et aromatiques, a fait l'objet de recherche de plusieurs études récentes grâce à leur composition chimique qui entrent dans la fabrication des médicaments, complément alimentaires et produits cosmétique.

Dans ce mémoire on s'intéresse à l'étude des caractéristiques physico-chimiques et l'activité antimicrobienne de l'huile végétale de nigelle cultivée, obtenue par première pression à froid à partir des graines de nigelle de la région de Syrie. La caractérisation physico-chimique a montré une densité de 0.920, un indice de réfraction de 1.4720, un indice d'acide de 19.074mg KOH/g HV et un indice de saponification de 214.863mg KOH/g HV. L'évaluation de l'activité antibactérienne a montré une sensibilité vis-à-vis le *Staphylococus aureus* et *Streptocoque beta hémolitique* avec des diamètres d'inhibition de 17 et 24 respectivement

Mots clés : huile végétale, nigelle cultivée, extraction, activité antibactérienne.

Abstract

The extraction of vegetable oils from medicinal and aromatic plants has been the subject of research in several recent studies because it contains chemical compositions which are part of the manufacture of drug, food supplements and cosmetic product.

In this work, we are interested in the study of the physico-chemical characteristics and the antimicrobial activity of cultivated black seed oil, obtained by first cold pressing from black

seed from the region of Syria. Physico-chemical characterization showed a density of 0.920, a refractive index of 1.4720, an acid number of 19.074 mg KOH/g HV and a saponification number of 214.863 mg KOH/g HV. Evaluation of antibacterial activity showed sensitivity to *Staphylococus aureus* and *beta hemolitic streptococcus* with inhibition diameters of 17 and 24, respectively.

Key word; vegetable oil, black seed, extraction, antibacterial activity.

Tables des matières

Remerciement

Dédicace

Résumés (arabe, français, anglais)

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Abréviations

Introduction générale…….. 1

Chapitre I : Huiles végétales

I.1.Historique……..... 3

I.2. Définition……..... 3

I.3.Composition des huiles végétales..... 3

I.3.1.Fraction saponifiable…….. 4

I.3.1.1.Triglycéride……. 4

I.3.1.2.Les acides gras……. 5

I.3.2.Fraction insaponifiable…….…….. 6

I.3.2.1.Vitamine liposolubles…….……. 7

I.3.2.2.Antioxydants ……. 8

I.4.Procédés industriels de production des huiles végétales……... 8

I.4.1.Nettoyage des graines……..…….. 8

I.4.2.Prétraitement des graines…….……... 8

I.4.3.Extraction de l'huile proprement dite…….…… 8

I.4.4.Raffinage des huiles……... 10

I.5.Procédés alternatifs d'extraction d'huile ……..... 11

I.5.1.Définition des fluides supercritique …….. 12

I.5.2.Principe de l'extraction par CO_2supercritique des huile végétales…… 13

I.6.Marché mondiale de production d'huile végétale…….…... 13

I.7.Conservation des huiles végétales……..….... 14

I.8.Conclusion……..….... 14

Chapitre II : Présentation de la plante étudiée

II.1.Introduction……..... 15
II.2 Historique……..…... 15
II.3.Etymologie……... 16
II.4.Classification…… 16
II.5.Description botanique de la nigelle cultivée ……... 17
II.6.Principaux constituants des graines du Nigelle cultivée……...……... 18
II.6.1.Huile essentielles…….. 19
II.6.2.Huile fixes…… 19
II.6.3.Polyphénoles et flavonoïdes …… 20
II.6.4.Saponosides…… 21
II.6.5.Alcaloïdes …… 22
II.6.6.Protéines…… 23
II.6.7.Vitamines et sels minéraux…….. 23
II.7.Culture de la nigelle cultivée……... 25
II.8.Utilisation de la nigelle cultivée……... 26
II.8.1.Usage culinaires…….…….. 26
II.8.2.Utilisation en médicine traditionnelle…….. 26
II.9.Activité biologique et propriétés pharmacologique…….…... 26
II.9.1.Activité antioxydante…….…….. 26
II.9.2.Activité antibactérienne et antifongique…….. 27
II.9.3.Activité antiparasitaire ……..……... 27
II.9.4.Activité anti-inflammatoire et analgésique……... 27
II.9.5.Activité antiulcéreuse…….…….. 27
II.9.6.Autres actions biologiques de la nigelle cultivées…… 28
II.10.Produit à base de nigelle…….…... 28
II.11.Toxicité……..…… 28
II.12.Conclusion……..…... 29

Chapitre III : Matériel et méthode

III.1. Objectif du travail……..... 30
III.2.Matériel et Produits utilisés…….…... 30
III.2.1.Matière végétale…….. 31
III.3.Caractérisation physico-chimique de l'huile végétale de Nigelle……..... 31
III.3.1. Caractérisation physique de l'HV…….…… 31

III.3.1.1.Densité relative…… 31
III.3.1.2.Indice de réfraction ……. 32
III.3.2.Caractérisation chimique de l'HV…….…….. 33
III.3.2.1.Indice d'acide (I_A)…… 33
III.3.2.2.Indice de Saponification (I_S)…… 33
III.3.2.3.Indice d'Ester (I_E)……. 34
III.4. Caractérisation par spectroscopie FTIR de l'HV…….. 34
III.5.Evaluation de l'activité antibactérienne.……..…... 34
III.5.1.Microorganismes testés…….. 35
III.5.2.Technique par contact direct…… 35
III.5.2.1.Préparation de l'inoculum……. 35
III.5.2.2.Ensemencement…… 35
III.5.2.3. Application des disques (ou aromatogramme)……... 36
III.5.3.Détermination de la concentration minimale (CMI)…… 38

Chapitre IV : Résultats et discussion

IV.1. Caractéristique organoleptique de l'HV……... 39
IV.2. Caractéristique physico-chimique de l'HV……..... 39
IV.3. Caractérisation par spectroscopie FTIR…… 40
IV.4. Evaluation de l'activité antibactérienne……..... 41
IV.4.1. Détermination du diamètre d'inhibition……..... 41
IV.4.2. Détermination de la concentration minimale d'inhibitrice (CMI)…….. 43
Conclusion générale…….. 46
Annexe
Référence bibliographie

Liste des tableaux

Tableau I.1	Coordonnée critique de quelque composé ……	12
Tableau II.1	Différentes appellation de *Nigelle Sativa L.* en plusieurs langues ……	16
Tableau II.2	Classification botanique de la *Nigelle Sativa L*……..	16
Tableau II.3	Description botanique de la Nigelle cultivée ……..	17
Tableau II.4	Composition chimique des graines de Nigelle cultivée …….	19
Tableau II.5	Principaux composées molécules isolées de la nigelle cultivée……	24
Tableau III.1	Matériel utilisés…….**.....**	30
Tableau III.2	Produits utilisés …….	30
Tableau III .3	Différentes souches bactériennes utilisées …….	35
Tableau IV.1	Caractéristique organoleptique d'huile végétale de nigelle cultivée …….	39
Tableau IV.2	Résultat de la caractéristique physico-chimique …….	40
Tableau IV.3	Diamètre d'inhibition de l'HV de nigelle cultivée sur différent souche bactérienne ……	43

Liste des figures

Figure I.1	Diagramme représente la composition des huiles végétales …..	4
Figure I.2	Réaction de formation de triglycéride …….	5
Figure I.3	Structure des acides gras ……..	5
Figure I.4	Structure et nomenclature des principales familles des acides gras ……...	6
Figure I.5	Structure chimique des différents tocophérols ……	7
Figure I.6	Structure chimique de β-caroténoïde ……..	7
Figure I.7	Procédés classique d'extraction d'huile à partir de graines oléagineuses …….	9
Figure I.8	Raffinage par voie chimique : étapes et composés éliminés ……	11
Figure I.9	Diagramme de phase d'un corps pur ……...	12
Figure I.10	Schéma simplifié d'une installation d'extraction par CO_2 Supercritique ……	13
Figure I.11	Répartition de la production mondiale d'huile végétale en 2017 …….	14
Figure II.1	Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de la Nigelle cultivée..	20
Figure II.2	Structures de quelque composé phénolique ……..	21
Figure II.3	Structures des saponosides à hédéraginine isolé à partir des graines de *Nigelle Sativa L.* ……..	22
Figure II.4	Structure chimique des principaux alcaloïdes de graines de nigelle cultivée ……..	23
Figure III.1	Réfractomètre utilisé pour mesurer l'indice de réfraction ……...	32
Figure III.2	Ensemencement par stries très serrées …….	36
Figure III.3	Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme …..	38
Figure IV.1	Détermination d'indice d'acide. L'apparition de la coloration rose…….	40
Figure IV.2	Détermination d'indice de saponification. La solution titrée……	41
Figure IV.3	Spectre FTIR de l'huile végétale de nigelle cultivée……	41

Figure IV.4 Diamètre d'inhibition de l'HVde nigelle cultivée sur différentes souche bactérienne…… 43

Figure IV.5 Evaluation de la CMI de l'huile de Nigelle vis-à-vis de *streptocoque beta hémolytique*…… 45

Figure IV.6 Evaluation de la CMI de l'HV de *nigella sativa L.* vis-à-vis de *staphylococus aureus*…….. 45

Symboles et abréviations

Abréviations

AA	Acide aminé
AFNOR	Association française de normalisation
AG	Acide gras
AGS	Acide gras saturé
AGMI	Acide gras mono insaturé
AGPI	Acide gras polyinsaturé
ANT	Antibiotique
CMI	Concentration minimale d'inhibition
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
d_{20}	Densité relative
DL50	Dose létale 50
DO	Densité optique
DPPH	2,2-diphényle 1-picrilhydrazyl
FTIR	Spectrométrie infrarouge à transformé de fourrier
GC-MS	Gaz chromatography-Mass pectroscopy
HCl	Acide chlorhydrique
HV	Huile végétale
KBr	Bromure de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
M	Molarité (mol/L)
Pc	Pression critique (atm)
SC	Supercritique
SNC	Système nerveux central
T	Température (°C)
Tc	Température critique (°C)

Symboles

α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
I_A	Indice d'acide
I_E	Indice d'ester
I_S	Indice de saponification
n_D^{20}	Indice de réfraction

LOUAGE A ALLAH, A LUI NOUS NOUS REPENTONS ET SUR LUI NOUS COMPTONS ET SUIVANT SA VOIE.

Introduction générale

Depuis l'antiquité, il y'a eu toujours la maladie et son remède, notre prophète Mohamed (salut merisécorde soit sur lui) a dit "Dieu n'a pas fait descendre de maladie qu'il n'en ai pas fait descendre de remède " citation de ELBOUKHARI.

Depuis longtemps l'homme reconnait et utilise les plantes pour se nourrir et pour traiter diverses maladies. Plusieurs nombre des plantes contient des milliers de substances actives trouver dans leurs différents organes soit dans les feuilles, les fleurs ou dans les racines. Ces principes actifs sont utilisés pour préparer les différents médicaments pharmaceutiques d'origine naturelle, et qui ont des effets thérapeutiques très efficace avec moins d'effets secondaires, contrairement aux médicaments d'origine chimique qui ont des effets secondaire dangereux**[1]**.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a estimé en 2002 que, pour se soigner, 80% de la population recourt toujours à la médicine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes. Ces espèces végétales de grande utilité pour la santé des populations méritent d'être étudiées afin de justifier et valider scientifiquement leur usage pour une meilleure utilisation**[2]**.

*Nigella Sativa L.*est l'une des plantes médicinales la plus utilisée à travers le monde. Depuis plus de 2000 ans, cette plante a été employée comme remède naturel au Moyen-Orient et en Extrême-Orient. Les extraits de ses graines sont largement utilisés dans la médicine traditionnelle pour traiter les troubles broncho-pulmonaires et gastro-intestinaux, et contre plusieurs pathologies notamment comme antidiabétique, antihypertenseur, anti-inflammatoire et antimicrobiennes.

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'extraction de l'huile végétale à partir des graines de *Nigella Sativa L.* par pression à froid, ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne et pharmaceutique de l'huile extraite.

Notre travail est composé de 4 chapitres :

- Une partie théorique comprenant deux chapitre (généralité sur les huiles végétale) et (présentation de la plante étudier : Nigelle cultivée).
- Une partie expérimentale est consacrée à :

- La caractérisation physico-chimique de l'huile.
- Les tests spectrophotométriques (FTIR)
- Etude microbiologie pour rechercher le diamètre de la zone d'inhibition et la CMI de l'huile sur différentes souche bactérienne.

➢ Dans le chapitre quatre les résultats obtenus sont traités et interprétés.

Ce travail se termine par une conclusion générale qui englobe les résultats obtenus et de perspective donnés.

Chapitre I :

Huiles Végétales

Chapitre I : Huiles végétales

I.1. Introduction

Les huiles sont utilisées par l'homme depuis les temps ancien et leurs utilisations ont évolué au cours des siècles. Les huiles végétales sont issues des graines et des fruits oléagineux et occupent une place très importante dans divers secteurs économique : les industries alimentaire, pharmaceutique et de la cosmétique.

I.2. Définition

Les huiles végétales sont extraites des graines, des amandes et des fruits. L'huile végétale est une matière grasse, onctueuse et épaisse, souvent liquide à température ambiante. Elles sont insolubles dans l'eau, soluble dans les solvants organiques non polaires.

I.3. Composition des huiles végétales

Les huiles végétales sont composées d'une grande variété de constituants et leurs, compositions sont représentées par des fractions saponifiables et insaponifiables (figure I.1).

Les triglycérides sont largement majoritaires. D'autres constituants naturellement présents en plus fiable quantité, sont dits constituant mineurs (1 à 5%) et regroupent des composés dont les structures variant tels que les phospholipides (0.1 à 0.2%), les stérols, les tocophérols et quelques substances anti-nutritives**[3].**

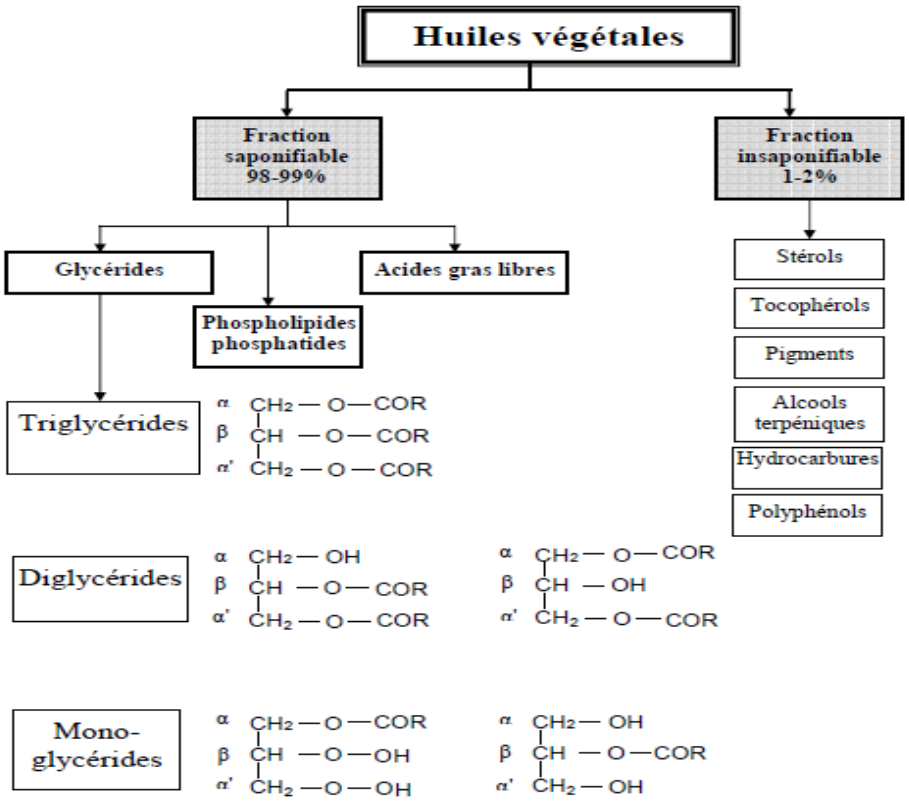


Figure I.1: Diagramme représentant la composition des huiles végétales**[4]**.

I.3.1. Fraction saponifiable

La fraction saponifiable d'une huile végétale représente un pourcentage massique de 98 à 99%, elle contient :

I.3.1.1. Triglycéride

Les triglycérides sont largement majoritaires et représentent au moins 95% du poids des huiles brute et 98% du poids des huiles raffinées. Ces triglycérides résultent de la combinaison d'une molécule glycérol avec trois molécules d'acide gras. Chaque molécule d'acide gras (R-COOH) possède une fonction d'acide (-COOH) qui peut réagir par estérification avec l'un des trois fonctions d'alcool (-OH) du glycérol pour former un triglycéride (figure I.2).

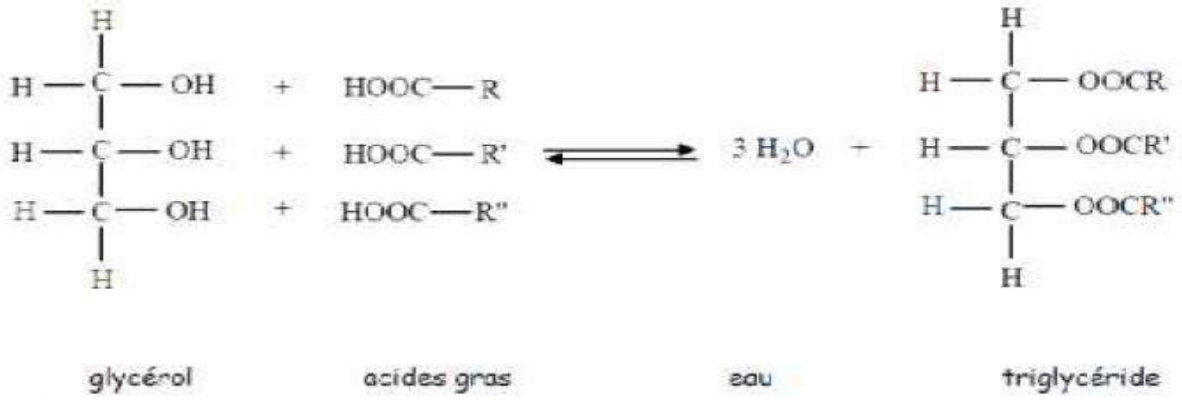


Figure I.2 : Réaction de formation de triglycéride**[5]**.

I.3.1.2. Les acides gras

Les acides gras sont des composés organiques de structure général R-COOH, constitué de carbone (C), d'hydrogène (H) et d'oxygène. Le poids d'une molécule d'acide gras est réparti entre ces trois éléments selon les proportions respectives de 76%, 12.7% et 11.3%**[6]**.

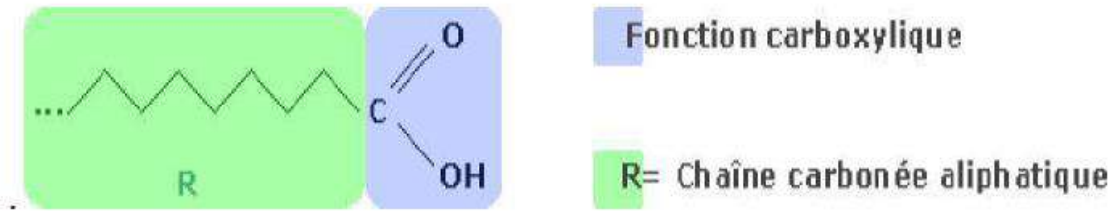


Figure I.3 : Structure des acides gras.

Les acides gras sont classés en trois groupes (figure I.4) :

- **Acides gras saturés (AGS)**

Ils sont constitués d'une chaine hydrocarbonée ne contenant aucune double liaison, avec principalement des longueurs de chaine comprises entre 16 (acide palmitique) et 18 atomes de carbone (acide stéarique).

- **Acides gras mono-insaturés (AGMI)**

Ce sont des acides qui contiennent une seule double liaison et dont le principal représentant est l'acide oléique($C18 : 1\ \Delta^9$).

- **Acides gras polyinsaturés (AGPI)**

On parle d'acide gras polyinsaturé lorsque la chaine hydrocarbonée comportant plusieurs doubles liaisons, dont on connait les deux principaux qui sont l'acide linoléique ($C18:2\ \Delta^{9,12}$) et l'acide α-linolénique($C18:3\Delta^{9,12,15}$).

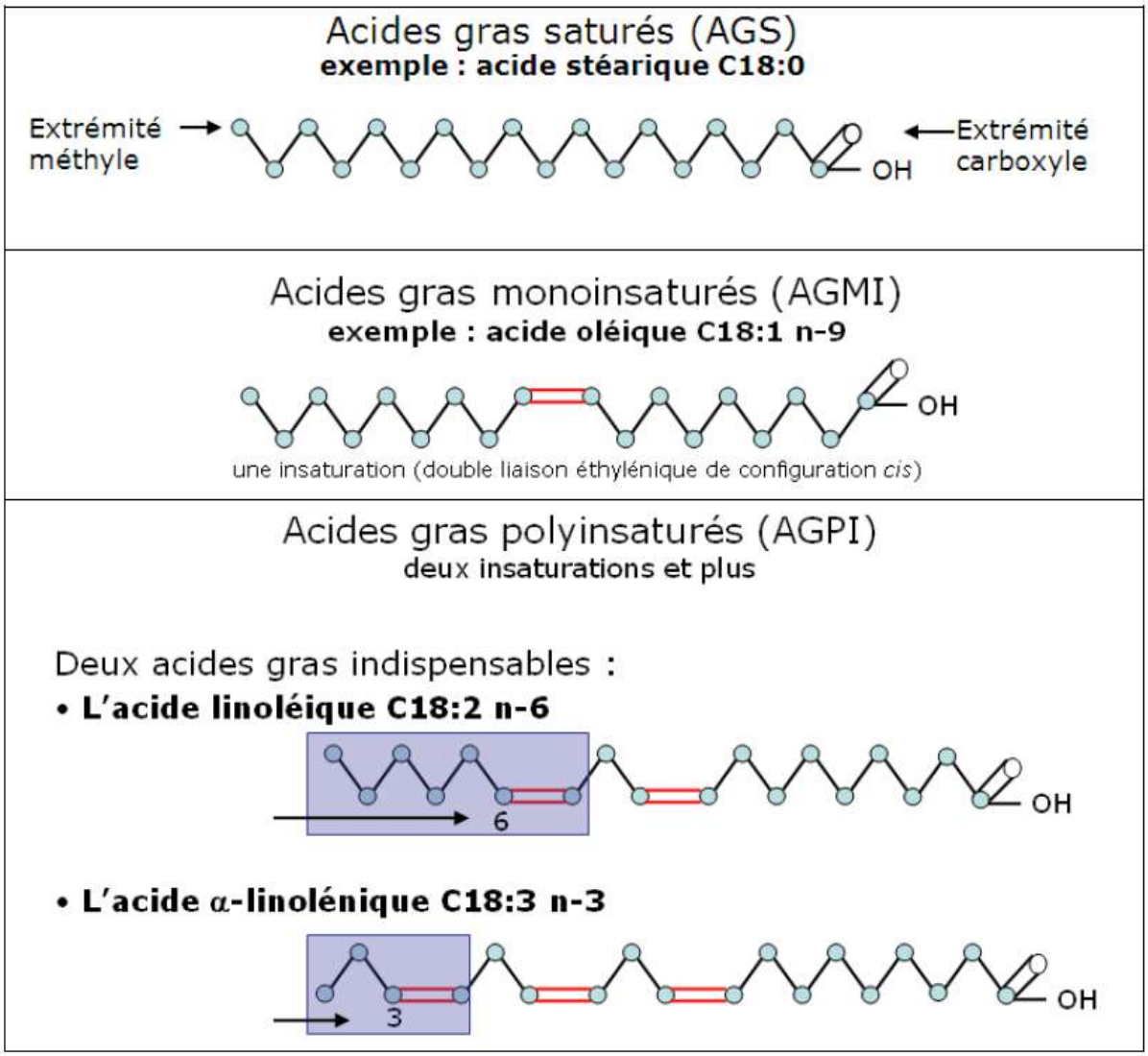


Figure I.4 : Structure et nomenclature des principales familles des acides gras**[7]**.

I.3.2. Fraction insaponifiable

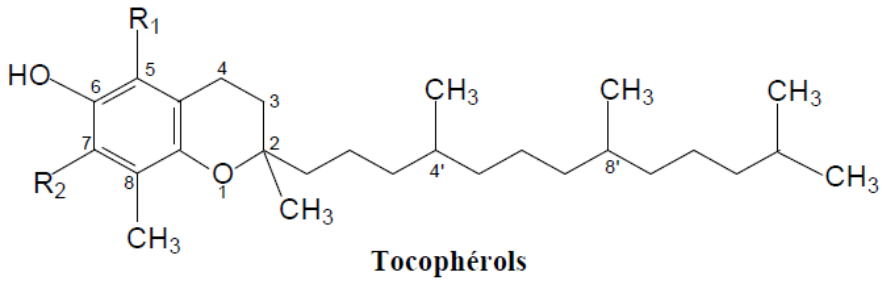
La fraction insaponifiable d'une huile végétale représente 1 à 2% des constituants non glycéridique et des lipides complexes appelés « constituants mineurs ».

I.3.2.1.Vitamines liposolubles

- **Tocophérol**

Outre leur activité pro vitaminique, les tocophérols (figure I.5) regroupés sous le nom générique de vitamine E, qui possède des propriétés antioxydants et qui participent à la conservation des huiles**[8]**.

De point de vu structural, ces composés se présentent essentiellement sou quatre formes (α, β, γ et δ).



Tocophérols

	R_1	R_2
α-tocophérol	CH_3	CH_3
β-tocophérol	CH_3	H
γ-tocophérol	H	CH_3
δ-tocophérol	H	H

Figure I.5 : Structure chimique des différents tocophérols.

- **Caroténoïde**

Ce sont des pigments lipophiles sensibles à la lumière (rayonnement ultraviolet) et à la chaleur, de formule brute $C_{40}H_{56}$, se présentent sous plusieurs formes (α, β et γ) dont la plus abondante est le β-carotène**[9]** (précurseur biochimique de la vitamine A).

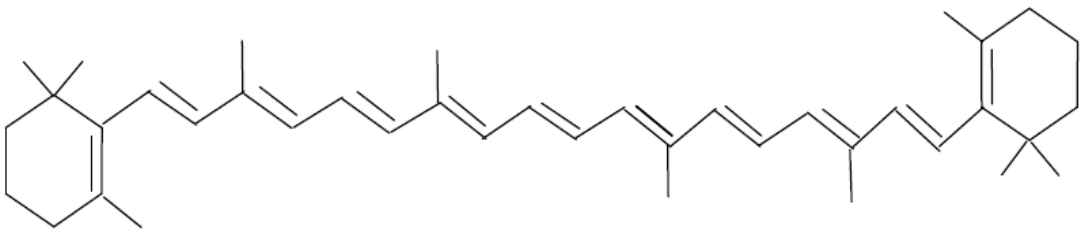


Figure I.6 : Structure chimique de β-caroténoïde.

I.3.2.2. Antioxydants

- **Tocotriénol**

De structure analogue au tocophérol, il possède certaines propriétés physiologiques qu'on n'observe pas chez le tocophérol**[10]**.

- **Phytostérol**

Les phytostérols ou stérols naturels sont un groupe de stérols naturellement présents dans les plantes. Ils se présentent sous la forme de poudre blanche, avec une odeur douce caractéristique, ils sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les alcools.

Toutes les huiles végétales en contiennent (de 0.1 à0.5% en moyenne) et leur structure moléculaire présente une forme analogue avec le cholestérol, ils ont un rôle hypocholestérolémiant qui ne peut être obtenue qu'avec la consommation de produits enrichis en phytostérols puisque l'apport total journalier est estimé à moins de 500 mg**[3]**.

I.4. Procédés industriels de production des huiles végétales

Trois procédés peuvent être utilisés pour extraire l'huile à partir des graines oléagineuses : la pression unique ou double, l'extraction par solvant et le procédé mixte, couplant le pressage à une extraction par solvant sur le tourteau**[11]**. Les étapes de l'extraction d'huile végétale sont les suivantes (figure I.7):

I.4.1. Nettoyage des graines

Les graines sont tamisées et nettoyées des impuretés (feuilles, tige…).

I.4.2. Prétraitement des graines

Avant d'être envoyées à l'étape d'extraction proprement dite, les graines sont souvent prétraitées afin de faciliter l'extraction de l'huile. Les prétraitements les plus fréquemment utilisés sont la cuisson, le floconnage et parfois un depelliculage des graines pour faciliter le pressage de graines**[13]**.

I.4.3. Extraction de l'huile proprement dite

- **Pressage**

Fait uniquement intervenir des presses exercent une pression sur les graines. A l'issue de l'étape de pressage, on obtient l'huile brute et le tourteau (appelé gâteau de pression) qui contient encore une teneur en huile résiduelle.

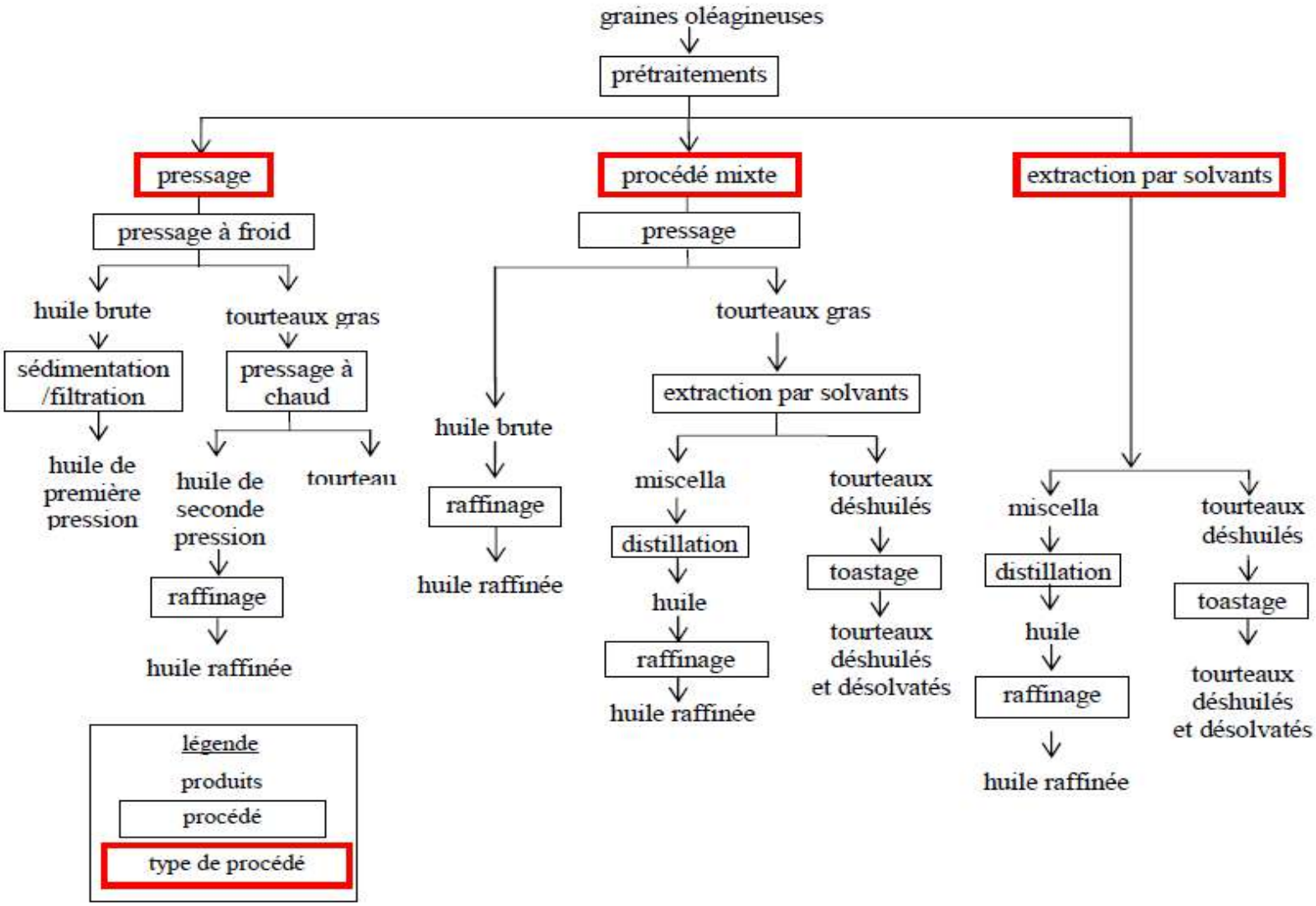


Figure I.7 : Procédés classique d'extraction d'huile à partir de graines oléagineuses**[12]**.

L'huile brute de pressage contient des particules fines nommées pied de presse. Ces solides sont séparés de l'huile en deux étapes. La séparation des plus grosses particules est réalisée par sédimentation dans un « *screening tank* ». L'huile de première pression obtenue est ensuite filtrée ou clarifiée dans un décanteur pour éliminer les particules résiduelles plus fine**[13]**.

- **Extraction de l'huile du tourteau**

Il existe plusieurs voies de valorisation de l'huile de tourteau. D'une part, l'huile contenue dans les tourteaux peut être extraite par des solvants organiques (généralement l'hexane). D'autre part, les tourteaux peuvent être pressés à nouveau. A l'issue de ce second pressage l'huile brute obtenue est qualifiée de seconde pression.

L'huile de première pression peut-être vendue en tant que telle, mais l'huile de seconde pression et extraite par solvant doit être raffinée avant de la fournir aux consommateurs, et qui réponde aux exigences réglementaires**[13]**.

I.4.4. Raffinage des huiles

L'huile brute obtenue par seconde pression et par solvant renferme un certain nombre d'impuretés indésirables, responsables du gout et de l'odeur désagréables et de leur mauvaise conservation (figure I.8).

Le raffinage comprend une série de traitements qui sont :

- **Dégommage**

Cette opération, qui consiste en l'ajout d'acide et/ou d'eau aux huiles brutes, permet d'éliminer les 0.2 à 1.8% de phospholipides qu'elles contiennent**[14][15]**.

- **Neutralisation et lavages**

Elle consiste à éliminer les acides gras libres de l'huile démucilaginée. Cette opération permet, en outre, d'éliminer la totalité des phospholipides, les traces de métaux et les produits dégradés par l'oxydation. Les techniques de neutralisation des huiles végétales les plus utilisées sont : la neutralisation chimique ou alcaline (par la soude)**[16]**et la neutralisation physique (distillation)**[17].** Après mélangeage et centrifugation, les pates de neutralisation formées sont lavées à l'eau à plusieurs reprises avant d'être séchées sous vide.

- **Décoloration**

Dans un décolorateur contenant de l'huile à 90 – 110°C sont introduits de 0.2 à 2% d'agents d'absorption tels que les terres décolorantes. Après une mise en contact de 30 min sous agitation et sous vide poussé, l'huile est refroidie puis filtrée afin d'en extraire les pigments encore présents**[14, 15]**.

- **Désodorisation**

Les composés volatiles contenus dans l'huile à 180 – 240°C sont enlevés par entrainement à la vapeur d'eau sous vide très poussé**[14, 15]**.

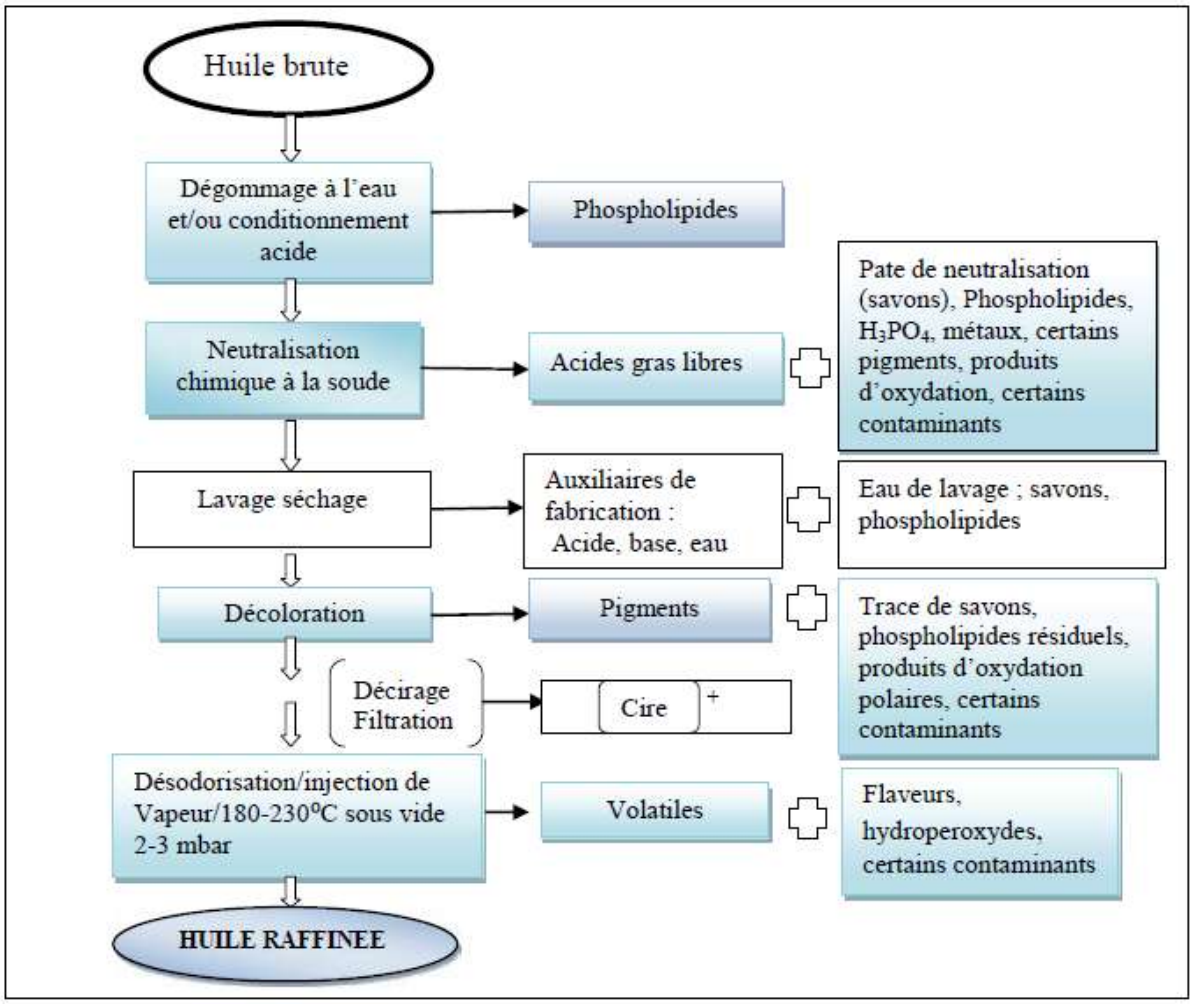


Figure I.8 : Raffinage par voie chimique: étapes et composés éliminés**[18]**.

I.5. Procédés alternatifs d'extraction d'huile

Le procédé industriel n'a pas énormément évolué depuis une cinquantaine d'année. La technologie industrielle de production des huiles brutes et tourteaux procédé toujours par pressage puis extraction à l'hexane**[19]**. Actuellement, l'hexane est le solvant d'extraction

préférentiellement utilisé, cependant l'inflammabilité de ce composé, sa toxicité et son prix indexé à celui du pétrole sont des inconvénients majeurs de son utilisation**[20]**. Les nouvelles voies explorées se situent notamment dans la recherche de solvants de substitution telle que l'éthanol**[21]** et iso-hexane**[22]**. Cependant le $\boldsymbol{CO_2}$ supercritique est le solvant ayant fait l'objet de recherche intensives ces vingt dernières années car le produit final ne contient pas de solvants résiduels**[23]**.

I.5.1. Définition des fluides supercritique

Un composé est en conditions supercritique lorsqu'il est porté à une température et à une pression supérieure à sa température et sa pression critique (Tc et Pc), comme représenté sur la figure (I.9).

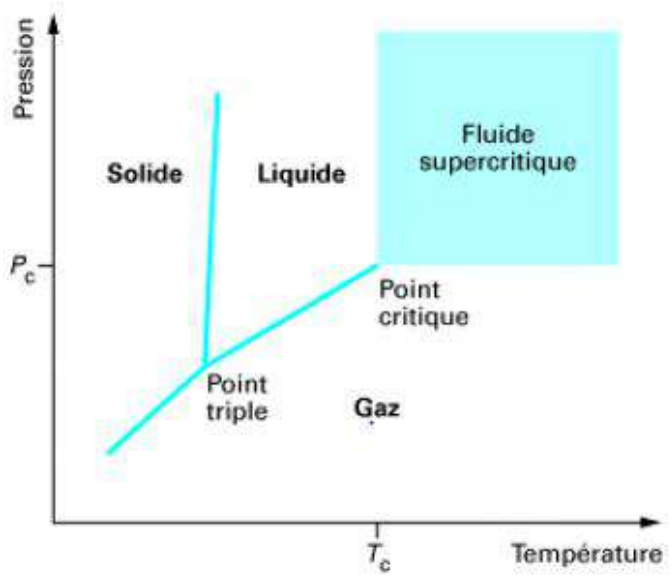


Figure I.9 : Diagramme de phase d'un corps pur**[24]**.

Différents corps purs peuvent être utilisés à l'état supercritique. A titre d'exemple les coordonnés critiques de quelques composées sont indiquées dans le tableau (I.1).

Tableau I.1 : Coordonnée critique de quelque composé**[25]**.

Solvant	Tc (°C)	Pc (bar)
Eau	374	218
Dioxyde de carbone	31	74
Ethanol	243	63
Acétone	235	47

Parmi ces solvants, le dioxyde de carbone et l'eau sont plus fréquemment étudiés en extraction par fluide supercritique. Ces solvants font partie de solvant reconnus comme non dangereux**[26]**et son peu couteux.

I.5.2. Principe de l'extraction par CO_2 supercritique des huiles végétales

Toute procédure d'extraction discontinue par fluide supercritique consiste en deux étapes principales : l'extraction suivie d'une séparation (figure I.10). Le solvant CO_2 après une étape de refroidissement et de pressurisation, est porté en conditions supercritiques (sc). Le CO_2 supercritique percole dans l'extracteur contenant la matière à extraire, avec un flux ascendant (A, figure I.10) ou descendant suivant les installations. La séparation du mélange extrait CO_2 supercritique a lieu par dépressurisation du CO_2 supercritique dans un séparateur. Cette étape permet de récupérer l'extrait et le CO_2 gazeux. A la suite de cette étape, le CO_2 est recyclé dans l'installation.

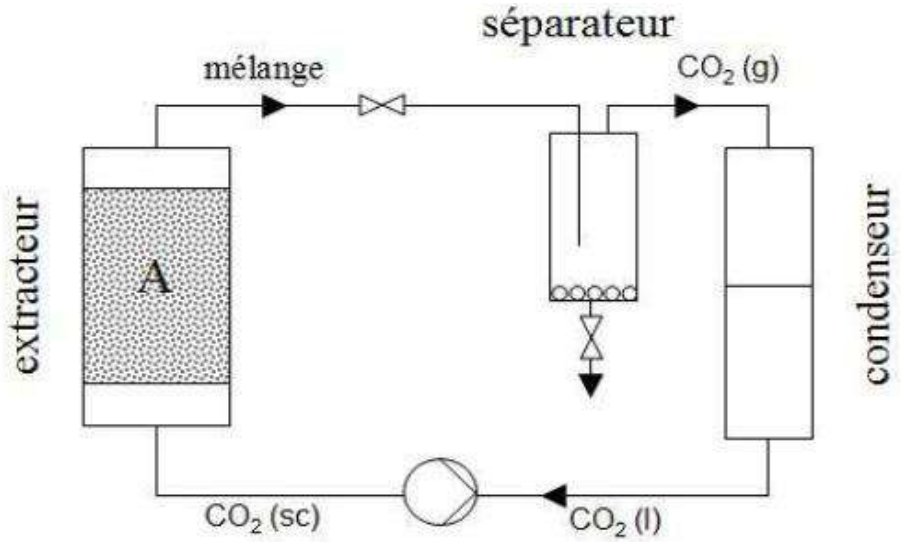


Figure I.10 : Schéma simplifié d'une installation d'extraction par CO_2 supercritique**[27]**.

I.6. Marché mondiale de production d'huile végétale

En 2017, la production mondiale d'huile végétale a atteint 193 millions de tonnes (figure I.11). Plus de 80% de cette production sont assurées par seulement cinq oléagineux : palme (35%), soja (28%), tournesol (10%), colza (13%) et olive (1%). Plus de 70% de cette production mondiale est utilisée par l'alimentation soit consommée directement, soit transformée par l'industrie agroalimentaire.

Les trois principaux producteurs des huiles végétales sont l'Indonésie, la Malaisie et l'UE (Union Européen)**[28]**.

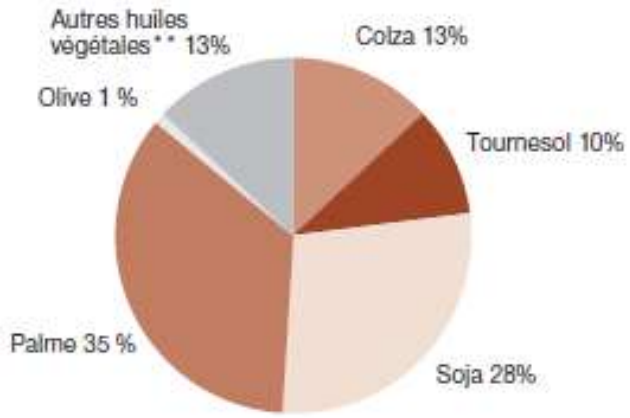


Figure I.11 : Répartition de la production mondiale d'huile végétale en 2017**[28]**.

I.7. Conservation des huiles végétales

Il est très important de conserver ses huiles végétales dans leur contenant bien fermé, à l'abri de la lumière et de la chaleur car les huiles peuvent rancir avec le temps à cause de l'oxydation des acides gras.

I.8. Conclusion

D'une manière globale, nous avons constaté que les huiles végétales sont des sources privilégiées de lipide et qui sont très utiles et répandues. On les retrouve dans tous les domaines. Chaque huile apparait comme un mélange indissociable doté de vertus thérapeutiques très intéressantes.

Nous avons pu aussi voir qu'il existe de nombreuses techniques d'extraction conventionnelle et d'autres récentes développées.

Chapitre II :

Présentation de la plante étudiée

Chapitre II : Présentation de la plante étudiée

II.1. Introduction

Généralement les plantes médicinales sont utilisées comme un traitement curatif et préventifs depuis les anciens temps ; plusieurs recherches pharmacologiques se fait pour confirmer les propriétés thérapeutiques des différents métabolites de ces plantes médicinales et aussi pour identifier les principes actifs d'origine naturel.

Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs. Elles produisent déjà 70% de nos médicaments, déjà environ 170000 molécules bioactives ont été identifiées à partir des plantes**[29]**.

II.2.Historique

La nigelle (*Nigella Sativa L.*) a été trouvée sur la tombe de *Toutankhamon*, elle était considérée par les Egyptien de l'antiquité comme une panacée. Chez les grecs anciens, la nigelle était considérée comme un remède précieux dans le traitement des affections hépatiques et digestives. Pour *Dioscoride* (médecin grec du premier siècle et auteur de « De Materia Medica »), les graines de nigelle étaient utilisées pour traiter les maux de tête, les algies dentaires, la congestion nasale et comme diurétique. Ces graines ont été aussi utilisées pour combattre les vers intestinaux et comme galactagogues**[30]**.

Le prophète Mohamed satisfaction et salut de dieu sur lui, avait dit : « soignez-vous en utilisant la graine noire c'est un remède contre tous les maux à l'exception de la mort ». Pour cette raison, plusieurs savants musulmans s'intéressèrent à cette graine.

C'est une herbe originaire du moyen orient, de l'Europe centrale et de l'ouest de l'Asie, elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde surtout dans le bassin méditerranéen et l'Inde**[31]**.

Nigella dérive du mot latin *Nigellus* qui signifie noirâtre, car les graines sont d'un noir intense, caractéristique des graines de nigelle**[32]**.Le nom d'espèce *sativa* vient du latin et signifie « cultivé».

II.3.Etymologie

Dans le monde, la plante *Nigelle sativa L.* est connue par plusieurs noms communs dont celles indiquées dans le tableau ci-dessous :

Tableau II.1: Différentes appellation de *Nigelle Sativa L.*en plusieurs langues**[33].**

Langue/ Pays	**Nom commun**
Anglaise	Black cumin, small fennel, fennel flower
Française	Cumin noir, nigelle cultivée, toute-épice
Arabe	Habbat-el-baraka, habba-tu-sawda, kamun-aswad, shunez, gesheh
Maroc	Sanuj
Egypte	Habatul baraka
Iran	Saiddaneh
Turquie	Corekotu
Indonésie	Jintenhitam
Inde	Mangral, kaladana, kalounji

II.4.Classification

Selon la classification botanique des Angiospermes de Cronquist (1988) basée sur les critères morphologiques, anatomiques et chimiques, *Nigella sativa L.*est une plante à graines, donc elle fait partie de l'embranchement des *Spermaphytes*, et de la famille des *Renonculacées*.

Tableau II.2 : Classification botanique de la *Nigella Sativa L.***[34].**

Embranchement	**Spermaphytes**
sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Série	Thalamiflore
Ordre	Ranales
Famille	Renonucléacées
Tribu	Helleborées
Genre	Nigella

II.5.Description botanique de la Nigelle cultivée

- La nigelle est origine de l'Asie accidentelle ; du moyen orient et de l'Inde**[35][36]**.
- En Algérie la nigelle est très peu cultivée, elle est limitée à l'échelle traditionnelle dans les régions d'Ouargla, Biskra, Timimoune, Adrar, Médéa et Skikda**[35][37][38]**.

Les différentes espèces de Nigelle ont des caractéristiques communes :

- Ce sont des plantes annuelles avec des feuilles très découpées, plumeuses, leurs segments plus ou moins linéaire.
- Les fleurs hermaphrodites sont pentamères et tétra cycliques avec ostentatoire blanche à sépale bleuâtre et jaunâtre persistant pendant un temps sur la maturation des fruits. Les pétales nectarifères (feuilles de miel) sont de taille réduite, et une lèvre d'échelle comme supérieure agissant comme un « couvercle » de protection**[39][40]**.

La Nigelle cultivée est une plante annuelle à tige dressée ramifiée ; à feuilles dentées ; à fleure bleu-gris assez petite de 2 à 2.5 cm de diamètre, manquante d'involucre sous la fleur et a gousse dentelées**[41][42]**.

Tableau II.3: Description botanique de la Nigelle cultivée**[33][43][44]**.

Partie de la plante	Photo
La tige : est fortement ramifiées, subcylindrique, nervurée et creuse quand elle est sèche. De couleur vert clair à vert foncé. Elle peut atteindre 60 cm de hauteur. **La feuille :** est plumeuse, divisée en lobes étroits, elle est lancéolée à linéaires et présente des onglets nectarifères. Les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues. **Les fleurs :** sont solitaires, axillaires et terminales. Elles sont bisexuées, radiales, très riches en nectar. Elles sont petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes de couleur bleu clair et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle.	

Le fruit : est une capsule formée de follicules soudés, s'ouvrant au sommet par une fente interne.	
La graine : est de couleur noirâtre avec un tégument assez dure ornementé de stries. La graine faisant en moyenne 2-3mm dans le sens de la langueur, elle a une base large puis se rétrécie en forme triangulaire anguleuse. En l'écrasant entre les doigts, elle dégage une odeur de camphre.	

II.6.Principaux constituants des graines du Nigelle cultivée

Les plantes aromatiques contiennent généralement deux types de métabolites : les métabolites primaires sont des molécules organiques pour assurer la survie des plantes ; les plus importants sont les sucres et leurs dérivés, les lipides et les protéines. Les métabolites secondaires jouent un rôle dans la défense contre les herbivores ; on distingue quatre familles de métabolites secondaires chez les végétaux qui sont les composés phénoliques, les saponines, les alcaloïdes et les composés terpéniques.

Les graines de nigelle cultivée contiennent des métabolites primaires qui participent au développement de la plante notamment les lipides, les protéines, les glucides ainsi que les fibres, et des métabolites secondaires. Ces derniers jouent un rôle de protection contre les attaques d'herbivores ou de pathogènes et améliorent l'efficacité de la reproduction. Ce sont ces composés qui sont recherchés par l'homme pour leurs activités pharmacologiques. La composition chimique des graines du Nigelle cultivée est résumée dans le tableau II.5.

Tableau II.4 : Composition chimique des graines de Nigelle cultivée**[45][46][47]**.

Constituants	Quantité (en g dans 1Kg)
Eau	38-78
Protéines	202-216
Lipides	320-406
Glucides	248-374
Fibres	66-84
Sels minéraux	37-45

II.6.1. Huiles essentielles

L'huile essentielle de la nigelle s'obtient par distillation à la vapeur d'eau de l'huile végétale obtenue par première pression à froid. Sa composition peut varier énormément suivant les pratiques culturales de la plante et les conditions environnementales. L'huile essentielle représente entre 1.4 à 1.9% du poids de l'huile fixe et 0.18 à 0.5% du poids des graines**[48]**. L'analyse de cette huile par GC-MS réalisée par *Bucar et al.*a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont : la thymoquinone (27.8% - 57%), p-cyméne (7.07% - 15.83%), carvacrol (5.8 - 11.6%) longifolène (1.2 – 8%), 4-terpinol (1.98 – 6.59%) et le tanethol (0.25 – 4.28%)**[49]**.

L'huile essentielle du *Nigella sativa L.* cultivée au Sahara algérien (Timimoune et Adrar), extraite par deux méthodes différentes ; l'hydro distillation et distillation par micro-onde a été analysée par CPG et GC-MS, 112 composés ont été identifiés et caractérisés, le p-cymène représente toujours le composé le plus abondant suivi de la thymoquinone**[50]**.

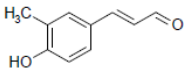
II.6.2. Huiles fixes

Généralement les huiles fixes (végétales) sont des sources d'énergies, l'extraction de ces huiles se fait par pression à froid. Les huiles végétales sont majoritairement composées de triglycérides (57.50%). Elles contiennent aussi une faible fraction de lipide polaires (3.70%), des monoacyl-glycérol (4.8%) et diacyl-glycérol (5.10%). On y trouve aussi des stérols libres et estérifiés**[51]**.

II.6.3. Polyphénoles et flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques dont la biosynthèse constitue l'un des processus fondamentaux de la phytochimie. Ils font partie de ce que l'on appelle les composés phénoliques. Les flavonoïdes sont des substances généralement colorées très répandus chez les végétaux. Les renonculacées sont un groupe riche en flavonols et en flavones. En 1997, trois nouveaux flavonoïdes triglycosylés ont été isolés à partir des graines de nigelle cultivée et leurs structures ont été déterminées (figure II.1)**[52]**:

1. Quercétine 3-glycosyl (1→2)galactosyl (1→2) glucoside
2. Kæmpférol3-glycosyl (1→2)galactosyl (1→2) glucoside
3. Quercétine 3-(6-feruloglucosyl)(1→2)galactosyl(1→2)glucoside

	R	R_1
1	OH	H
2	H	H
3	OH	

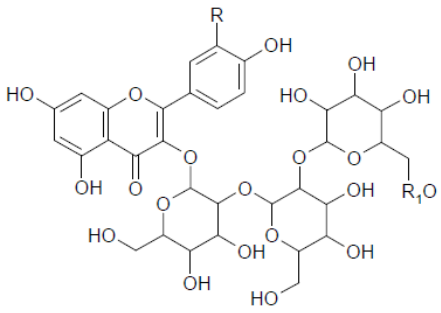


Figure II.1: Structure chimique des trois flavonoïdes isolés de la Nigelle cultivée**[52]**

En 2008, quatorze composés phénoliques ont été isolés à partir d'un extrait méthanolique de pousse et de racines de Nigelle cultivée. Ceux-ci sont : l'acide gallique, l'acide para-hydroxybenzoïque, l'acide chlorogénique, l'acide vanillique (figure II.2), l'acide para-coumarique, l'acide férulique, l'acide trans-2-hydroxycinnamique, l'acide trans-hydrocinnamique, l'épicatéchine, la catécgine, la quercétine, l'apigénine, l'amentoflavone et la flavone**[53]**.

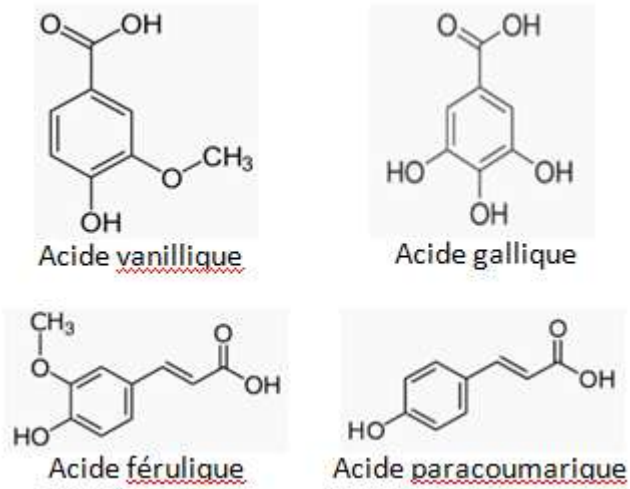


Figure II. 2: Structures de quelque composé phénolique.

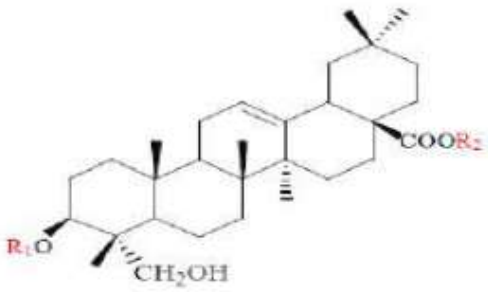
II.6.4. Saponosides

Les saponosides sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes. Ce sont des composés très répandus dans le règne végétal, solubles dans l'eau. Ils libèrent par hydrolyse un ou plusieurs oses et une génine (sapogénine). La première saponine isolée par *Greenisch* en 1882 à partir des graines de nigelle cultivée est la mélianthine, dont l'aglycone est l'hédéragénine**[54]**.

Récemment, d'autres saponosides ont pu être isolés à partir d'un extrait éthanolique des graines de nigelle cultivée dont le 3-O-[beta-D-xylopyranosyl-(1-3)-alpha-Lrhamnopyranosyl-(1-2)-alpha-L-arabinopyranosyl]-2**[55]**, alors que de nombreux autres saponosides ont pu être déterminés à partir des huiles de nigelle cultivée**[56]**.

Une étude a permis d'isoler à partir de l'extrait méthanolique trois autres saponosides apparentés à l'α-hédérine, avec l'élucidation de leurs structures par des méthodes chimiques et spectrales (figure II.3)**[57]**:

- ✓ 3-O-β-D-xyl(1-3)-α-Lrha-(1-2)-α-ara-28-O-α-L-rha(1-4)-β-D-glu(1-6)-β-D-glu-hédéragénine
- ✓ 3-O-α-L-rha-(1-2)α-L-ara-28-O-α-L-rha(1-4)-β-D-glu(1-6)-β-D-glu-hédéragénine
- ✓ 3-O-β-D-xyl(1-3)-α-L-rha-(1-2)-α-L-ara-hédéragénine.



R1	R2
1= α-L-rha(1-2)-α-Lara	H
2= β-D-xyl(1-3)-α-L-rha(1-2)-α-L-ara	H
3= α-L-rha(1-2)-α-L-ara	α -rha (1-4)- ß-D-glu (1-6)- ß-D-glu
4= β-D-xyl(1-3)-α-L-rha(1-2)-α-L-ara	α -rha (1-4)- ß-D-glu (1-6)- ß-D-glu

Avec 1= α-hédérine

Figure II. 3: Structure des saponosides à hédéraginine isolés à partir des graines de *Nigella Sativa L*[57].

II.6.5. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances présentant un caractère alcalin, contenant de l'azote, le plus souvent inclus dans un hétérocycle. Les alcaloïdes ont, pour la plupart, des actions physiologiques et thérapeutiques à faibles dose. Ils deviennent cependant très toxiques à forte doses.

Les plus importants alcaloïdes de la nigelle cultivée, ont été isolés à partir des graines entre 1985 et 1995, sont :

- ✓ Nigellicine, à noyau indasole**[58]**
- ✓ Nigellimine, une isoquinoléine**[59]**
- ✓ NigellimineN-oxyde, dérivé N-oxyde de la nigellimine**[60]**
- ✓ Nigellidine, également un indazole**[61]**

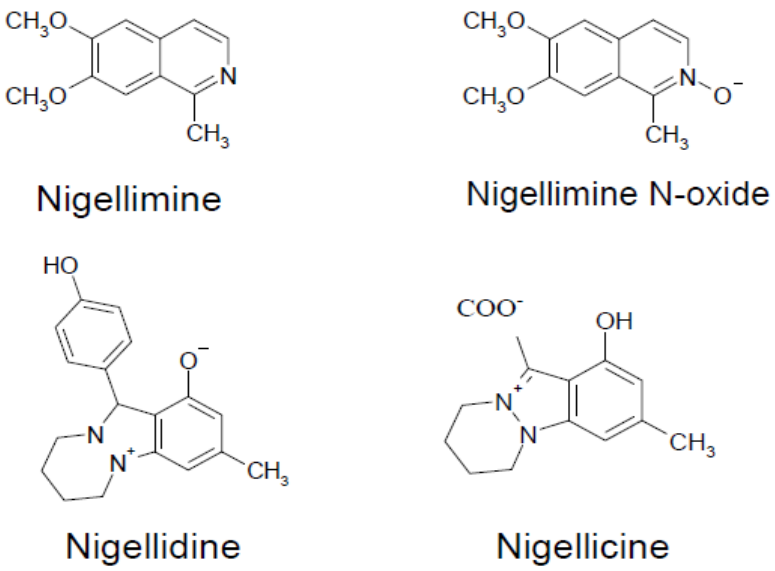


Figure II. 4: Structure chimique des principaux alcaloïdes de graines de nigelle cultivée.

II.6.6. Protéines

Les graines de la nigelle cultivée sont très riches en protéines (environ 20%), avec dominance d'acide glutamique (22.4%), d'acide aspartique (10.05%) et d'arginine (9.18%)**[62]**.

La protéine la plus étudiée jusqu'à maintenant est la lipase qui catalyse des réactions de transesterification**[63]**. L'analyse des acides aminés de l'hydrolysat de ces protéines révèle la présence de 17 acides aminés y compris les 8 acides aminés essentiels**[64][65]**.

II.6.7.Vitamines et sels minéraux

La composition en vitamines a été déterminée et elle révèle la présence des vitamines A, B1, B2, B6, PP et de l'acide folique**[45]**.

Les tocophérols totaux constituent 0.05% de l'huile, et sont constitués majoritairement de l'α-tocophérol (48%) et du γ-tocophérol (28%). D'autres vitamines liposolubles comme le β-carotène (0.05%) et la vitamine K1 (0.1%).

Des travaux sur la composition minérale de la graine de la nigelle cultivée ont rapporté que sa teneur en potassium est importante (1.018% de poids total de la graine) et que le calcium, le fer, le sodium représentent 0.188, 0.0575 et 0.0853% respectivement**[66]**. La teneur des graines en sélénium a été également déterminée, elle représente 0.27 à 0.54 mg/Kg de graines**[66]**.

Les molécules isolées à partir des différentes parties de cette plante sont regroupées dans le tableau II.6

Tableau II.5: Principaux composés et molécules isolées de la nigelle cultivée**[67]**.

Composé	Nature	Partie de la plante
Alanine	AA	Graine
B-amyrin	Triterpène	Huile de graine
Acide arachidique	AG	Huile de graine
Acide arachidonique	AG	Huile de graine
Acide ascorbique	Vitamine	Feuille
Acide aspartique	AA	Graine
5-dehydro-avenastérol	Stéroïde	Huile de graine
7-dehydro-avenastérol	Stéroïde	Huile de graine
Butyrospermol	Triterpène	Huile de graine
Campestanol	Stéroïde	Huile de graine
Carvacrol	Monoterpène	Huile de graine
Campestérol	Stéroïde	Huile de graine
Carvone	Monoterpène	Huile de graine
Cholestérol	Stéroïde	Huile de graine
Citrostadienol	Triterpène	Huile de graine
Cycloartanol	Triterpène	Huile de graine
Cycloarténol	Triterpène	Huile de graine
Cycloeucalénol	Triterpène	Huile de graine
Cystine	AA	Graine
Damascenine	Alcaloïde	Plante entière
Méthyl-damascenine	Alcaloïde	Graine
Dithymoquinone	Monoterpène	Huile de graine
Dna	Alcaloïde	Racine
Acide Eicosadienoique	AG	Huile de graine
Huile essentielle	Terpènes	Graine
Huile fixe	Lipides	Graine
Flavonoides		Graine
Glucose	Ose	Graine
Acide glutamique	AA	Graine
Gramistérol	Stéroïde	Huile de graine
Hederagénine	Triterpène	Graine
Acide Indole-3-acétique	Auxine	Tissus du calice
Leucine	AA	Graine
Acide linoléique	AG	Huile de graine

Acide linolénique	AG	Huile de graine
Lysine	AA	Graine
Melanthine	Saponoside	Graine
Acide myristique	AG	Huile de graine
Nigellicine	Alcaloïde	Graine
Nigellimine-N-Oxide	Alcaloïde	Graine
Nigellone	Polymère de thymoquinone	Graine
Obtusifoliol	Stéroïde	Huile de graine
Acide oléique	AG	Huile de graine
Acide palmitique	AG	Huile de graine
Acide palmitoléique	AG	Huile de graine
Saponine	Triterpènes	Graine
Protéines	Protides	Graine
β sitostérol	Stéroide	Huile de graine
α spinastérol	Stéroïde	Huile de graine
Acide stéarique	AG	Huile de graine
Stigmastanol	Stéroïde	Huile de graine
Stigmastérol	Stéroïde	Huile de graine
Taraxérol	Triterpène	Huile de graine
Acide telfarique	AG	Huile de graine
Thymol	Monoterpène	Huile de graine
Thymoquinone	Monoterpène	Huile de graine
Tirucallol	Triterpène	Huile de graine
Tryptophane	AA	Graine
Valine	AA	Graine
Nigellidine	Alcaloïde	Graine

II.7.Culture de la nigelle cultivée

La plante est très peu exigeante et pousse sur des terrains argileux ou sablonneux, dans des endroits chauds et peu humides.

Les graines sont semées en général au printemps, elles commencent leur germination dans les trois à quatre semaines. Après environ six mois de croissance végétative, la floraison apparait et les graines continuent leur maturation pendant un bon mois encore. Dès le jaunissement des feuilles, le brunissement des follicules, la récolte peut être faite à l'automne pour séchage à l'ombre**[68]**.

Dans les régions chaudes, avec un hiver doux, comme en Inde, les graines sont semées en automne-hiver pour une récolte au printemps-été.

II.8.Utilisation de la Nigelle cultivée

II.8.1. Usages culinaires

Les graines de nigelle entière ou moulues sont utilisées comme épice. Elles servent à saupoudrer le pain, les pâtisseries, les plats sucrés, les fromages, les sauces et les soupes pour les rendre plus appétissants**[69]**.

II.8.2.Utilisation en médicine traditionnelle

Au Maroc, la Nigelle cultivée est également utilisée contre le rhume, la grippe, les sinusites, la migraine, l'asthme, les hémorroïdes, dans les affections pulmonaires et les algies dentaires. A faible dose, elle est préconisée comme galactagogue, anti-nauséeuse, vermifuge, emménagogue, antipyrétique, antidote d'intoxications par poisons et antivenimeuse. Par voie locale, elle est employée dans le traitement des verrues, des cors, du vitiligo, des dartres et de la paralysie faciale**[70][71]**.

En Algérie, la nigelle cultivée (confondue avec la nigelle de damas) est employée en cas de fièvre, d'algies dentaire, de maux de tête, de rhumes de cerveau, comme diurétique et emménagogue. En infusion, elle est indiquée dans les nausées, les gastralgies, les vomissements et les coliques. Ecrasées dans l'huile, les graines sont employées comme liniment efficace contre la constipation et les céphalées **[72-75]**.

II.9.Activité biologiques et propriétés pharmacologiques

Depuis un siècle, plusieurs travaux ont porté sur l'étude de cette plante, notamment les effets dus aux extraits contenant les principaux constituants de la graine sur divers systèmes in vivo et in vitro. Parmi ces effets on cite :

II.9.1.Activité antioxydante

L'huile végétale et ses fractions (lipide neutre, phospholipides et glycolipides) ont montré une activité antioxydante vis-à-vis les deux radicaux libres stables : le DPPH et le glavinoxyl. Cette activité antioxydante est corrélée à la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile**[76]**.

*Houghton et al.*ont montré que l'huile végétale brute de la nigelle cultivée et le thymoquinone pure (c'est le composé majoritaire d'huile essentielle) inhibent la peroxydation lipidique non enzymatique dans les liposomes**[77]**.

II.9.2.Activités antibactériennes et antifongique

Les différents extraits de graines de la nigelle cultivée présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches bactériennes.

L'huile végétale de cette plante possède des propriétés antibactériennes. En 1999, une étude montre que l'emploi de l'huile de nigelle dans la conservation des aliments, à une teneur de 0.1%, inhibe la croissance des microorganismes**[78]**. Une excellente activité antifongique de cette huile est prouvée notamment sur *Aspergillus Niger***[79]**.

II.9.3.Activités antiparasitaire

L'huile fixe de graines de *Nigella Sativa L.* présente des propriétés anti-céstodales et anti-nématodique comparable à celle de la pirérazine**[53]**. D'autre travaux rapportent que l'huile végétale de la graine administrée par voie oral (à raison de 2.5 à 5 mg/Kg) pendant deux semaines, abaisse le nombre de *Schistosomamansori* dans le foie et diminue le nombre des œufs déposés dans le foie et les intestin**[80]**.

II.9.4.Activités anti-inflammatoire et analgésique

Plusieurs études ont proposé que l'huile essentielle issue des graines de la nigelle cultivée est responsable d'une importante activité analgésique, cette action ayant été antagonisée par la naxolone**[81]**. Cette huile présente en outre un effet réducteur significatif sur le système nerveux central (SNC).

Les résultats obtenus, d'après les travaux réalisés par *Abdel Fattah et al.*, suggèrent que l'huile essentielle de Nigelle et le thymoquinone pure produisent un effet anti-nociceptif par activation indirecte des récepteurs du type 1 superspinal μ_1 et k-opioide**[81]**.

II.9.5.Activités antiulcéreuse

Les études réalisées par *Kanter et al.***[82]** ainsi que *Zaoui et al.***[83]**, montrent que l'administration d'huile essentielle de Nigelle à raison de 0.88 g/Kg par jour pendant deux semaines, augmente la mucine gastrique et le contenu en glutathion et diminue le taux d'histamine, sans affecter l'acidité libre ni le suc gastrique. Des études complémentaires sont

nécessaires pour démontrer les mécanismes d'action des différents extraits des graines de la nigelle. En effet, cette plante présente déjà des applications en phytothérapie, notamment sous forme de gélules à base d'huile fixe revendiquant l'allégation « complément alimentaire à activité immuno-modulatrice ».

II.9.6.Autres actions biologiques de la nigelle cultivée

Plusieurs autres activités biologiques de *N.Sativa* ont été rapportées dans la littérature, notamment :

- Activité antidiabétique.
- Activités respiratoire et immunologique.
- Activités anti carcinogène et antimutagène.
- Activité neuroleptique.
- Activité cardiovasculaire.

II.10.Produit à base de nigelle

Les produits de nigelle sont de forme :

- Capsules à base d'huile fixe.
- Gélules de poudre de nigelle.
- Crème.
- Huile.

II.11.Toxicité

La toxicité est évaluée par la mesure de la dose létale 50 (DL50). Elle s'exprime en mg de matière active par Kg d'animal. Plus ce chiffre est petit, plus la substance est toxique.

Les DL50 obtenues pour des doses uniques d'huile végétale de graines de nigelle par voie orale et intra-péritonéale chez la souris ont été de 28.8 et 2.06 ml/Kg respectivement. L'étude de la toxicité chronique de l'huile fixe de nigelle a été réalisée sur des rats pendant 12 semaines avec des doses journalières per os de 2 ml/Kg de poids corporel. Aucune modification histopathologique des tissus du cœur, foie, reins et pancréas n'a été observée, le dosage des enzymes hépatiques n'a pas été modifié non plus après les 12 semaines de traitement. Cependant une diminution significative des paramètres sérique comme le cholestérol, les triglycérides, le glucose, les leucocytes et les plaquettes, a été remarquée

comparativement au groupe témoin, et à l'inverse, l'hématocrite et l'hémoglobine ont été augmentés. Ces résultats laissent suggérer que l'huile fixe de *Nigella Sativa L.* possède un index thérapeutique élevé, mais les modifications au niveau du métabolisme de l'hémoglobine ainsi que la chute du nombre de leucocytes et plaquettes sont à prendre en considération**[83]**.

Une étude publiée en 2012 a confirmé l'effet toxique de l'huile végétale de la nigelle cultivée. Des doses journalières de 15 et 25 ml/Kg de poids corporel ont été administrées à des rats par voie orale durant un mois. Des modifications au niveau des structures histologiques du cortex rénal et à moindre degré au niveau des cellules hépatiques ont été rapportées**[84]**.

II.11. Conclusion

La nigelle est une plante aromatique, médicinale est un condiment populaires utilisé depuis longtemps, c'est l'une des plantes dont les huiles de graines contiennent plusieurs composants bioactifs et par conséquence elle est caractérisée par un large spectre d'activités thérapeutiques vis-à-vis différentes pathologies humaine.

Chapitre III :

Matériel et Méthodes

Chapitre III : Matériel et Méthodes

III.1. Objectif du travail

L'objectif de ce travail consiste à la caractérisation physico-chimique et microbiologique de l'huile végétale de la Nigelle cultivée, obtenue par pression à froid à partir des graines de nigelle. La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de l'annexe de la direction de la Santé (DSP) de la wilaya de Médéa, ainsi qu'au niveau du laboratoire de Chimie 1 du Hall Technologie.

III.2. Matériel et Produits utilisés

Le matériel et les produits utilisés lors de cette étude expérimentale sont rassemblés dans le tableau III.1 et III.2 respectivement.

Tableau III.1 : Matériel utilisés

Matériels	Fournisseurs
Agitateur / plaque chauffante	Heidolph
Balance	Adventurer (OHAUS)
Réfractomètre	Fxacta+optech
Etuve	Niive
Vortex	Heidolph
Spectrophotomètre IR transformé de fourier	/
Spectrophotomètre UV-visible	SHIMADZU

Tableau III.2 : Produits utilisés.

Nom	Formule générale	M (g/mol)	Pureté (%)	Fournisseurs
Ethanol	C_2H_6O	46.07	96	Sigma-Aldrich
Ether de pétrole	/	/	/	/
Hydroxyde de potassium	KOH	56.11	97	BDH chemicals Ltd
Acide chlorhydrique	HCl	36.5	37	Chem-Lab NV
Phénophtaléine	$C_{20}H_{14}O_4$	318.32	/	Sigma- Aldrich
Bouillon de Muller Hinton	/	/	/	Liofilchem

Gélose de Muller Hinton	/	/	/	/
Tween 85	/	/	/	Sigma- Aldrich
Eau physiologique stérile	/	/	/	/

III.2.1. Matière végétale

La matière végétale utilisée dans notre étude est constituée d'une plante : la *nigella.sativa L*, elle est récoltée dans la région de Syrie. Seules les graines commercialisées sont utilisées pour l'obtention d'huile végétale.

III.3. Caractérisation physico-chimique de l'huile végétale de Nigelle

Les méthodes utilisées pour déterminer les caractéristiques physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

III.3.1. Caractérisation physique de l'HV

III.3.1.1.Densité relative

La densité relative est le rapport de la masse d'un certain volume de substance à 20°C, et la masse d'un volume égale d'eau distillée à la même température. On la mesure à l'aide d'une balance analytique**[85]**.

Le protocole de mesure est le suivant :

- Nettoyer soigneusement le pycnomètre et le sécher.
- Déterminer la masse $\boldsymbol{m_0}$ du pycnomètre vide.
- Remplir le pycnomètre avec de l'eau distillée jusqu'à le trait de jauge
- Déterminer la masse $\boldsymbol{m_1}$de pycnomètre rempli d'eau distillée.
- Nettoyer et sécher le pycnomètre.
- Remplir le pycnomètre avec l'HV jusqu'à trait de jauge.
- Déterminer la masse $\boldsymbol{m_2}$ de pycnomètre contenant l'HV.

La densité relative de l'HV est calculée en utilisant l'équation **(III.1)**

$$\boldsymbol{d_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}} \quad \textbf{(III.1)}$$

Avec :

$\mathbf{m_0}$ **:** Masse (g) du pycnomètre vide.

$\mathbf{m_1}$ **:** Masse (g) du pycnomètre rempli d'eau.

$\mathbf{m_2}$ **:** Masse (g) du pycnomètre rempli d'HV.

III.3.1.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'un milieu homogène, transparent, isotrope peut être défini comme étant le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passent de l'air dans l'HV maintenue à température constante. Conventionnement les indices de réfraction sont mesurés à 20°C, à l'aide d'un réfractomètre**[85]**.



Figure III. 1: Réfractomètre d'Abbe utilisé pour mesurer l'indice de réfraction.

Le protocole de travail est décrit ci-dessous :

- Nettoyer la lame du réfractomètre en utilisant du papier absorbant.
- Etalonner le réfractomètre en utilisant l'eau distillée.
- Déposer quelques gouttes d'HV à analyser dans la lame de réfractomètre et régler le cercle de chambre sombre et claire dans la moitié, et effectuer la lecture des résultats en prenant compte de la température du laboratoire 19°C.

L'indice de réfraction est déterminé par l'expression de calcul **(III.2)**

$$\boldsymbol{n_D^{20} = n_D^T + 0.0004(T - 20)} \text{..... (III.2)}$$

Avec :

$\boldsymbol{n_D^{20}}$ **:** L'indice de réfraction à 20°C.

$\boldsymbol{n_D^T}$ **:** L'indice de réfraction à la température de l'analyse.

T : la température de l'échantillon pendant l'analyse.

III.3.2. Caractérisation chimique de l'HV

III.3.2.1. Indice d'acide (I_A)

L'indice d'acide $\boldsymbol{I_A}$ est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'Hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1g de substance**[85]**.

Protocole

- Dissolvez 1g d'HV, dans 50 ml d'un mélange à volumes égaux d'éthanol et éther. Le solvant doit être neutralisé au préalable par KOH (0.1 M) en présence de phénophtaléine.
- Après dissolution, titrez par KOH (0.1 M). Le titrage est terminé lorsque la couleur rose persiste. Nous tenant ensuite le volume de la solution de KOH utilisée.

L'indice d'acide est calculé par la formule **(III.3)**

$$\boldsymbol{I_A = \frac{5.91 * n}{M}} \text{.....(III.3)}$$

Avec :

5.91 : Equivalent de KOH.

n : volume de KOH (ml).

M : masse d'HV (g).

III.3.2.2. Indice de Saponification (I_s)

C'est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres et à la saponification des esters présents dans 1g de substance**[85]** .

Protocole

Dans une fiole de 250 ml de verre munie d'un réfrigérant à reflux, introduisez la prise d'essai (1g) d'huile végétale de *Nigella sativa L.* Ajoutez 25 ml d'Hydroxyde de potassium alcoolique (0.5 M) et quelque billes de verre. Adaptez le réfrigérant et chauffez à reflux pendant 30 min. Ajoutez 1ml de solution de phénophtaléine et titrez immédiatement (alors que la solution est encore chaude) par l'acide Chlorhydrique 0.5M (n_1 ml d'acide Chlorhydrique 0.5 M). Effectuez un essai à blanc dans les mêmes conditions (n_2 ml d'acide Chlorhydrique ml 0.5M).

L'indice de saponification est calculé par l'équation **(III.4)**

$$I_S = \frac{28.05*(n_2-n_1)}{M} \text{.....} \quad \textbf{(III.4)}$$

Avec:

n_1 **:** Volume de HCl nécessaire pour la neutralisation de l'échantillon (ml).

n_2 **:** Volume de HCl nécessaire pour la neutralisation de l'essai à blanc (ml).

M **:** Masse d'échantillon (g).

III.3.2.3. Indice d'Ester (I_E)

C'est nombre qui exprime en milligrammes la quantité de KOH nécessaire à la saponification des ester présents dans 1g de substance. Il est calculé à partir de l'indice de Saponification et l'indice d'Acidité.

$$I_E = I_S - I_A \text{.....} \quad \textbf{(III.5)}$$

III.4. Caractérisation par spectroscopie FTIR de l'HV

- Le spectre infrarouge de l'huile est obtenu à partir d'un spectromètre infrarouge. Une pastille est réalisée en mettant sous presse la poudre obtenue après avoir mélangé notre huile à analyser et le KBr sec préalablement broyée dans un mortier.
- Les proportions sont les suivantes : nous prenons quelques mg de KBr broyé en poudre avec quelques gouttes d'huile végétale de *Nigelle cultivée*, le mélange est comprimé sous pression. La pastille obtenue doit être la plus translucide possible. Après avoir été placée dans le support approprié, la pastille est positionnée sur la trajectoire du rayon. Le spectre est alors enregistré.

III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne

Les tests de l'effet antibactérien des huiles végétales forment une étape de la recherche pharmaceutique, ils sont utilisés pour tester la sensibilité des bactéries.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne d'huile végétale testée a été réalisée par deux méthodes : aromatogramme et celle de dilution.

III.5.1. Microorganismes testés

Les souches microbiennes testes ont été fournies par le laboratoire d'hygiène de l'établissement publique de santé de proximité (DSP).

Tableau III. 3: Différentes souches bactériennes utilisées

Souches bactériennes	Gram
Escherichia coli	-
Klabsiella pneumoniae	-
Enterobacter cloacae	-
Proteus vulgaris	-
Proteus mirabilis	-
Klebseilla oxitocoque	-
Staphylococus aureus	+
Streptocoque beta hémolitique	+

III.5.2.Technique par contact direct

La technique comprend trois grandes étapes qui sont:

- Préparation de l'inoculum.
- Ensemencement.
- Application des disques (ou aromatogramme).

Tous d'abord on fait la préparation de pré culture. Objectif de ce dernier est de périmètre l'adaptation au milieu liquide de la souche et l'obtention d'une culture en phase exponentiel de croissance. Prélever à l'ance de plaine l'équivalent d'une colonie et introduire dans 10 ml d'eau physiologique stérile. On homogénéisé bien la suspension. Pius à l'aide d'un écouvillon ensemencé 3 à 4 stries dans la boite pétri déjà coulé de gélose Mueller hinton.

III.5.2.1. Préparation de l'inoculum

On a stérilisé une pipette pasteur avec la flamme de bec benzène, puis on a pris deux à trois colonies pures et bien isolées qu'on décharge dans un tube contenant 10ml de l'eau physiologique stérile. On homogénéise bien la suspension.

III.5.2.2. Ensemencement

Après avoir coulé le milieu de culture gélosé Mueller Hinton dans les boites de pétri, l'ensemencement a été fait par technique d'écouvillonnage en faisant un ensemencement par stries très serrées (figure III.2).



Figure III.2 : Ensemencement par stries très serrées

III.5.3.3. Application des disques (ou aromatogramme)

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode de disques.

À l'aide d'une pince stérile, les disques imprégnés dans huile végétale de *nigella sativa L.* sont déposés délicatement sur a surface des boites pétri inoculée par la gélose.

- **Incubation**

On fait l'incubation des boites pétris dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries.

- **Lecture**

Elle consiste à mesurer le diamètre des zones d'inhibition autour des disques à l'aide d'une règle graduée (figure III.3).

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre <8mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre >20mm**[86]**.

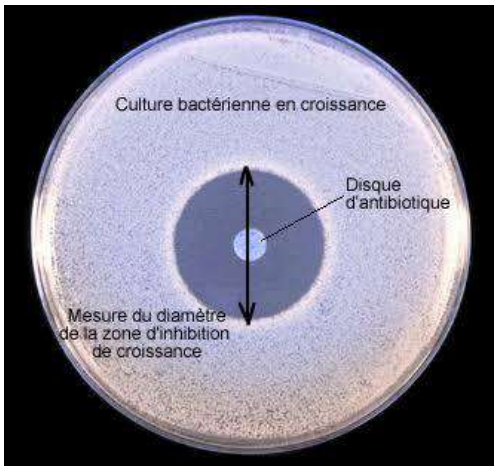


Figure III.3: Schéma simplifié du principe de la méthode de l'aromatogramme.

On a utilisé un seul antibiotique de référence pour toutes les souches testées : Chloramphenicol (C). Le choix de notre antibiotique est basé sur la sensibilité des souches testées.

III.5.3.Détermination de la concentration minimale (CMI)

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en HV capable d'induire une réduction de la croissance microbienne de 90%, donc elle ne laisse survivre que 10% de population**[87]**.

Le principe de la méthode consiste à diluer l'HV dans un milieu de culture solide ou liquide et à inoculer ce milieu avec les souches bactériennes sensibles à l'HV.

On va déterminer la CMI de notre HV en utilisant les bactéries *Staphylococus aureus* et *Streptocoque Beta hémolytique* par la méthode de dilution en milieu liquide.

Méthode de dilution en milieu liquide

Cette technique consiste à inoculer, par une suspension bactérienne, une série de dilution d'HV effectuée dans du milieu Mueller Hinton bouillon-Tween 85 (0.01%, v/v), de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre (100% à $4.76*10^{-5}$%). Déposer 0.5 ml d'une suspension bactérienne dans chacun des tubes de la série, lesquels sont incubée après agitation en vortex, à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries. Un témoin de la croissance bactérienne, pour lequel 0.5 ml de la suspension bactérienne ont été déposés dans du milieu Muller Hinton bouillon- Tween 85 (0.01%, v/v) est également réalisé (figure III.5).

Après quoi on les observe macroscopiquement, le premier tube dans lequel il n'ya plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les tube sont centrifugés ensuite à 6000T, pendant 5 minutes pour confirmer la présence ou non de précipité bactérienne.

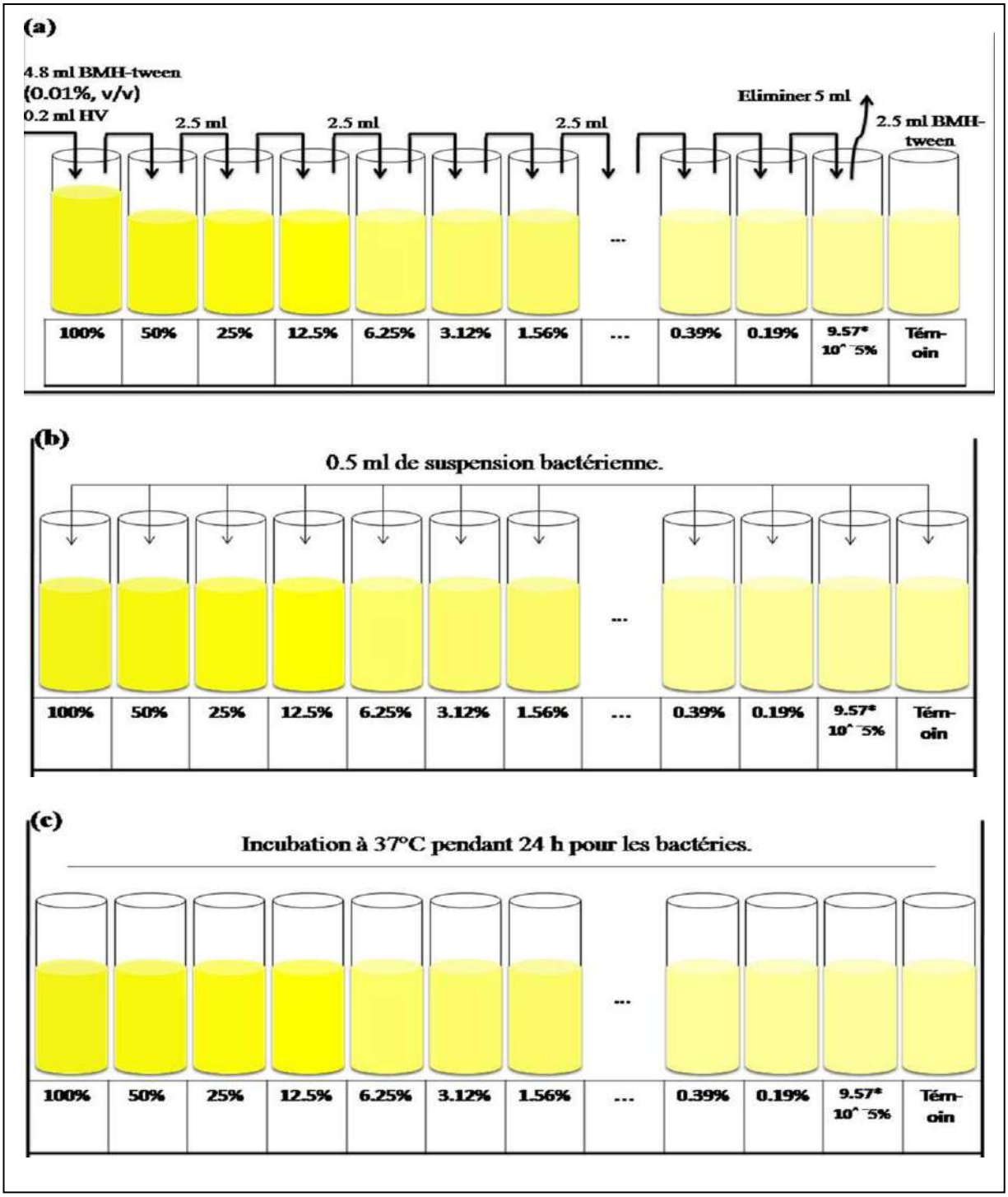


Figure III.4 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide

Chapitre IV :

Résultats et discussion

Chapitre IV : Résultats et discussion

Dans le chapitre précédent, on a décrit toutes les méthodes appliquées lors de l'étude expérimentale. A présent, ce chapitre est consacré aux résultats obtenus ainsi que toutes les interprétations concernant deux parties de cette étude.

- La caractérisation physico-chimique et spectroscopique de l'huile végétale de Nigelle cultivée.
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne ainsi que la détermination de la CMI.

IV.1.Caractéristiques organoleptiques de l'HV

L'huile végétale de Nigelle cultivée est obtenue par pression à froid des graines de Nigelle, le liquide obtenu est de nature visqueuse et de couleur jaune à brun. Les caractéristiques organoleptiques de cette huile sont résumées dans le tableau IV.1

Tableau IV. 1 : Caractéristique organoleptique d'huile végétale de *Nigelle cultivée.*

Aspect	Liquide huileux
Couleur	Jaune à brun
Odeur	A une odeur forte caractéristique de *nigella sativa L.*

IV.2. Caractérisation physico-chimique de l'HV

Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile végétale étudiée.

La détermination de la densité de l'huile nous donne des informations sur sa pureté. Elle est en fonction de la composition de l'huile ainsi que la température de l'expérience. La densité de notre l'huile mesurée est de 0.920 et elle est proche de celle trouvée par Atta**[87]**.

Les résultats de mesure de densité, indice de réfraction, indice d'acide, indice de saponification et l'indice d'ester sont regroupés dans le tableau IV.2.

L'indice de réfraction (IR) est utilisé comme critère de pureté. Plus l'indice de réfraction d'un produit est près de la valeur attendue, plus sa pureté est grande. L'IR de notre l'huile à 20°C est de 1.4720 et il est presque similaire à celui trouvé par Atta (1.4732).

Les valeurs de l'indice d'acide et de saponification sont inférieures à ceux mentionnées par Atta**[88]**, cela revient peut être à l'origine des graines (l'Égypte dans le cas des travaux de Atta) ainsi aux conditions de culture et de stockage de ces graines.

Tableau IV. 2: Résultats de la caractérisation physico-chimique de l'HV

			Résultats	**Normes[88]**
HV de Nigelle cultivée	Caractéristiques physiques	Densité	**0.920**	0.921 ± 0.0002
		Indice de réfraction	**1.4720**	1.4732
	Caractéristiques chimique	Indice d'acide	**19.074**mg KOH/g HV	11
		Indice de saponification	**214.863**mg KOH/g HV	192
		Indice d'ester	**195.789**mg KOH/g HV	181



Figure IV.1 : Détermination d'indice d'acide. L'apparition de la coloration rose



Figure IV.2 : Détermination d'indice de saponification. La solution titrée

IV.3. Caractérisation par spectroscopie FTIR

La spectroscopie infrarouge joue un rôle très important dans la caractérisation et l'identification des groupements fonctionnels des composés des plantes.

La caractérisation par spectroscopie FTIR de l'HV de la Nigelle cultivée est réalisée au niveau du laboratoire d'analyses physico-chimiques du Hall Technologie. Le spectre IR obtenu est représenté dans la figure **IV.3**

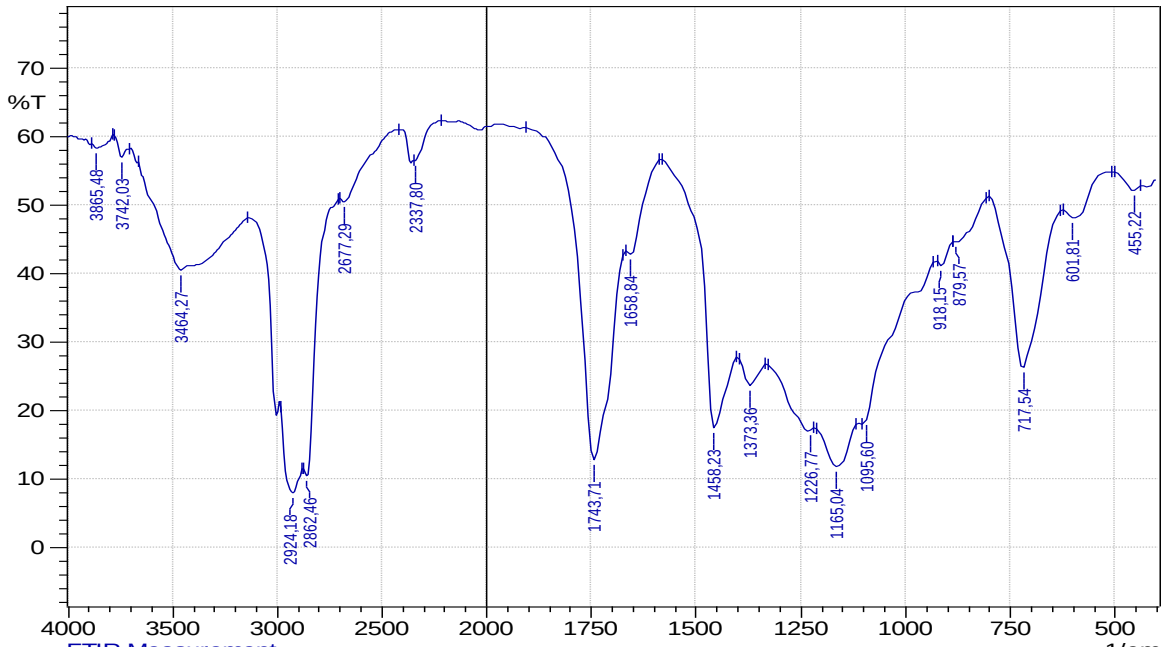


Figure IV.3: Spectre FTIR de l'huile végétale la Nigelle Cultivée

D'après la figure IV.3, le spectre FTIR de notre l'huile présente une large bande d'absorption à 3464.27 cm^{-1} qui a été affectée à la vibration du groupe hydroxyle du carboxyle (R-COOH), les bandes à 2924.18 et 2862.64cm^{-1} ont été attribuées aux vibrations de la liaison C-H des groupe d'alcane (CH_2,CH_3). Un groupe intense à 1743.7 cm^{-1}attribuée à la vibration de la liaison carbonyle (C=O), la bande à 1658.84 cm^{-1}a été affecté à la vibration de la liaison du C=C, les bandes à 879.57 et 717.4 cm^{-1}correspondant au mode vibrationnel du cycle aromatique.

IV.4. Evaluation de l'activité antibactérienne

IV.4.1. Détermination du diamètre d'inhibition

L'évaluation du pouvoir antimicrobien de l'huile de Nigelle est testée vis-à-vis de 8 souches bactériennes pathogènes via la méthode des disques. Les observations effectuées sur l'effet d'HV des graines de *nigelle sativa L.* sur la croissance des souches microbiennes testées, sont représentées dans le tableau IV.3et la figure IV.4.

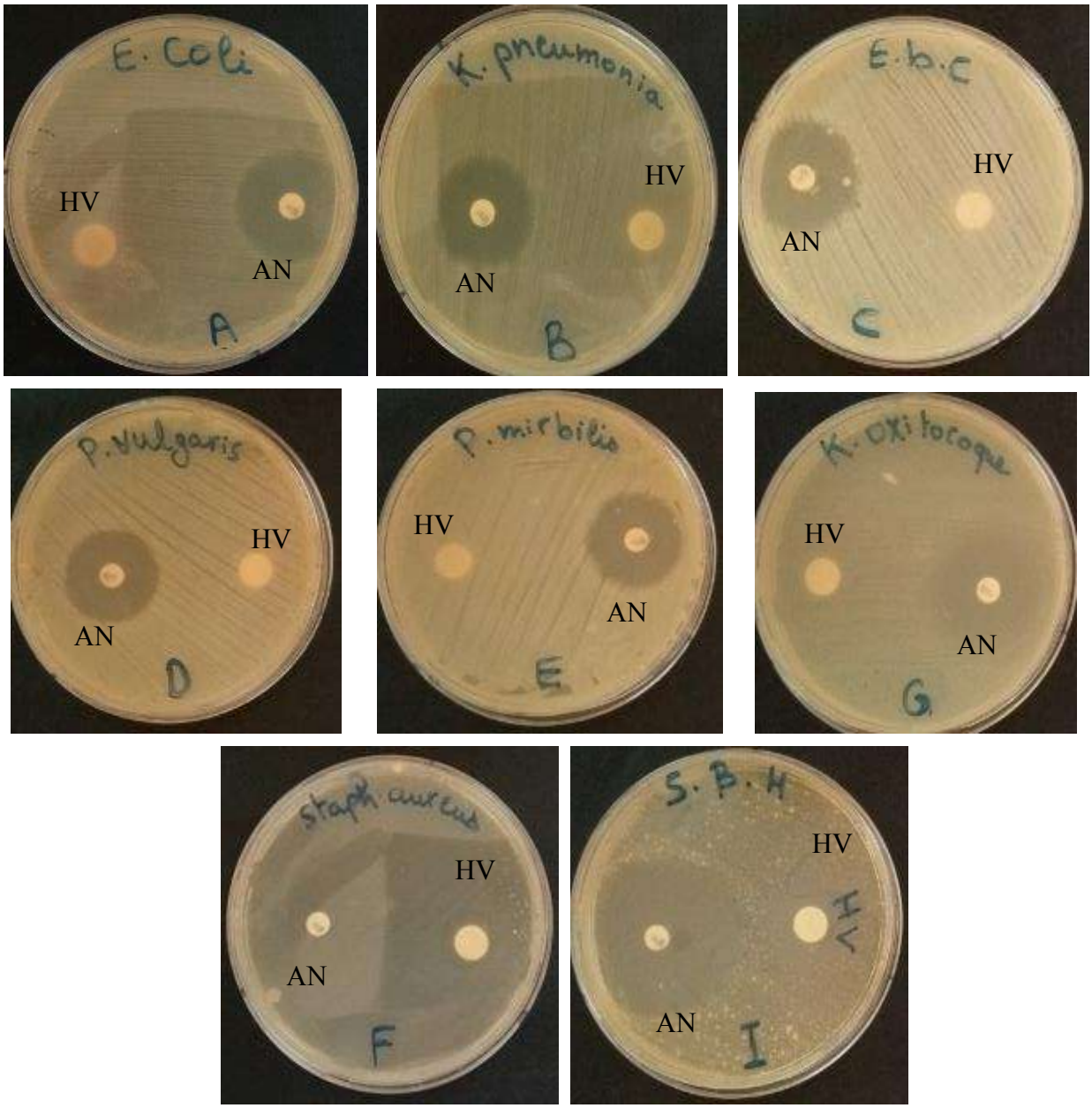


Figure IV.4: Diamètre d'inhibition de l'HV de Nigelle cultivée sur les différentes souches bactériennes.

A partir des résultats présentés dans la figure IV.4 et le Tableau IV.3, on remarque que :

- ✓ L'huile de Nigelle possède une activité antimicrobienne vis-à-vis *Staphylococus aureus* et *Streptocoque beta hémolitique*
- ✓ Les autres bactéries sont résistantes à l'huile de Nigelle, ce qui permet de dire que notre huile n'a aucun pouvoir inhibiteur sur ces bactéries.

Tableau IV. 3: Diamètre d'inhibition de l'HV de *nigella sativa L* sur différent souche bactérienne.

Souches bactériennes	**Diamètre d'inhibition en (mm)**	
	HV	**ANT (Chloramphenicol)**
Escherichia coli	0	28
Klabsiella pneumoniae	0	24
Enterobacter cloacae	0	25
Proteus vulgaris	0	25
Proteus mirabilis	0	24
Klebseilla oxitocoque	0	27
Staphylococus aureus	17	25
Streptocoque beta hémolitique	24	35

Donc à partir des résultats trouvés, on peut tirer les conclusions suivantes :

- La bactérie *Streptocoque beta hémolitique* est extrêmement sensible à l'HV de Nigelle cultivée avec un diamètre d'inhibition supérieur à 20 mm.
- La *Staphylococcus aureus* est très sensible avec un diamètre d'inhibition compris entre 15 et 19 mm.
- Les bactéries de gram (-), (*Escherichia Coli, Klabsiella pneumoniae, enterobacter cloacae, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis* et *Klebseilla oxitocoque*) sont résistantes à notre l'huile.

Les bactéries Gram négatif étaient généralement plus résistantes aux huiles que Gram positive. La grande résistance des bactéries à Gram (-) est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries à gram (+).

IV.4.2.Détermination de la concentration minimale (CMI)

La concentration minimale inhibitrice de l'huile végétale du Nigelle, est déterminée par la méthode de dilution en milieu liquide sur les bactéries *streptocoque beta hémolytique et staphylococus aureus,* selon la procédure citée dans la partie III.5.3. Les résultats trouvés sont schématisés sur les figures IV.5, IV.6, IV.7 et IV.8 respectivement.

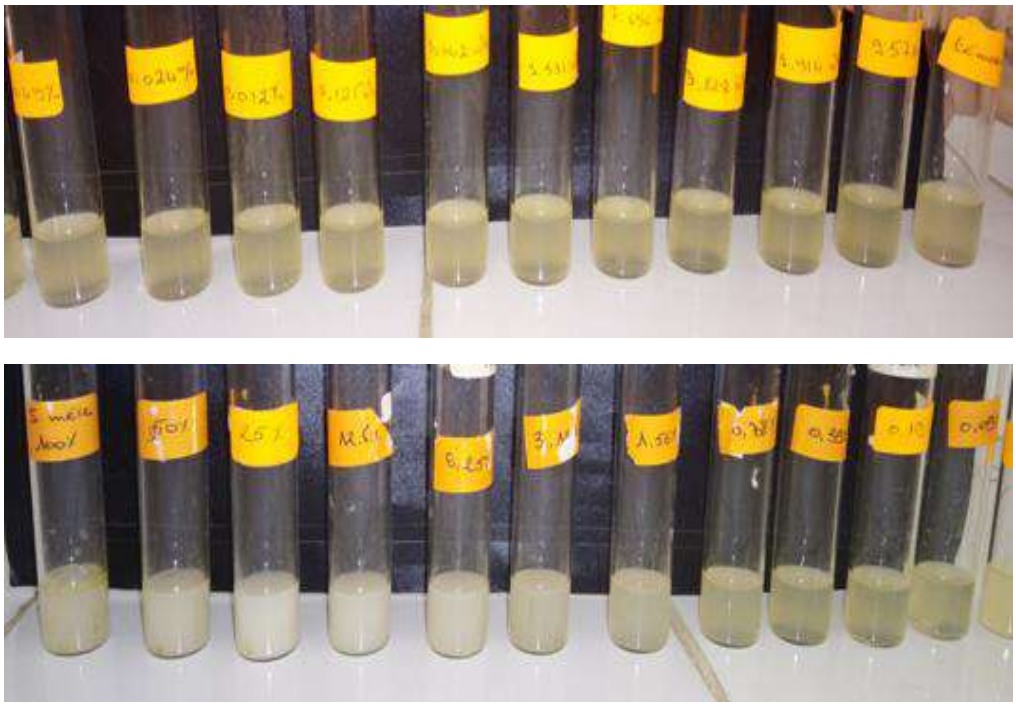


Figure IV. 5: Evaluation de la CMI de l'huile de Nigelle vis-à-vis de *streptocoque beta hémolytique*

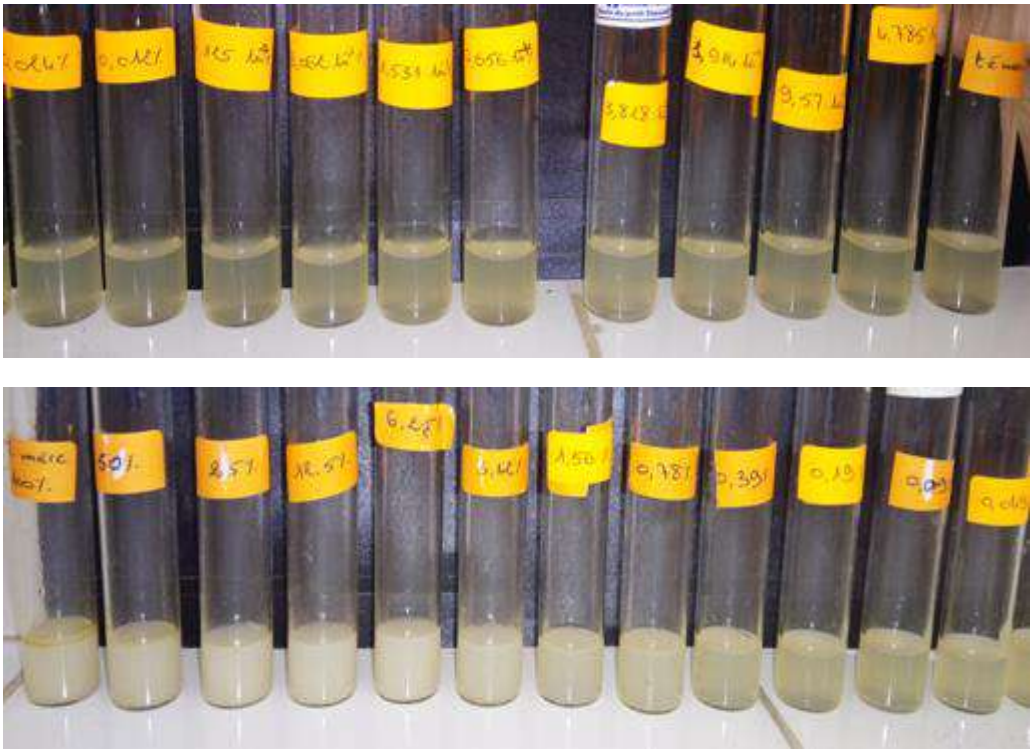


Figure IV. 6: Evaluation de la CMI de l'HV de Nigelle cultivée vis-à-vis de *staphylococus aureus.*

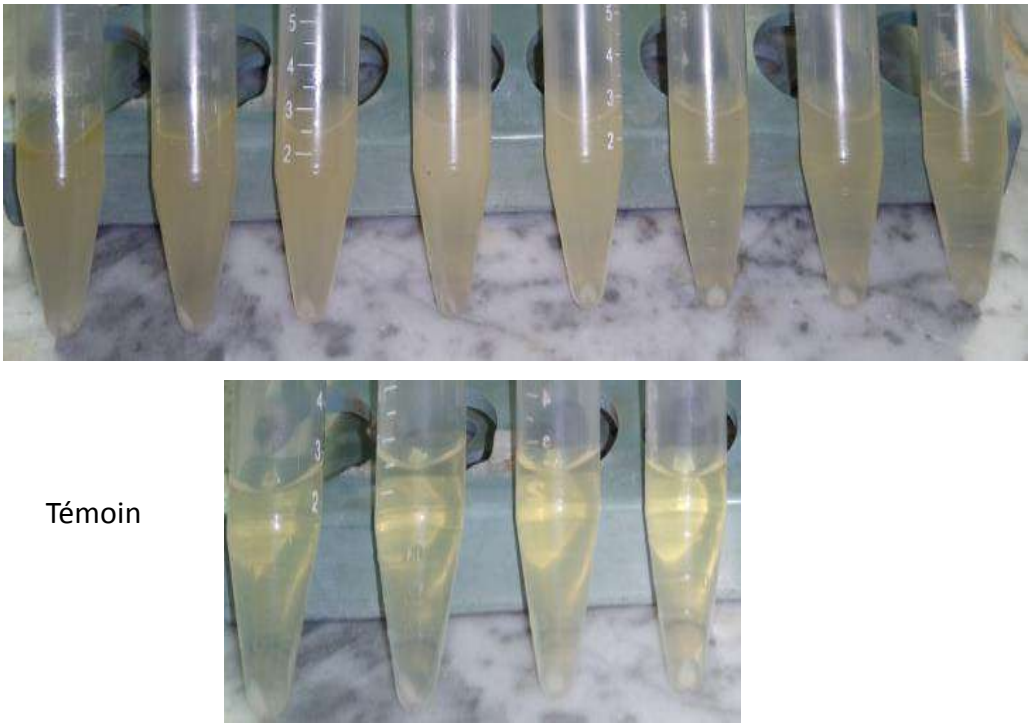


Figure IV.7: Evaluation de la CMI de l'huile de Nigelle vis-à-vis de *streptocoque beta hémolytique*(après centrifugation)

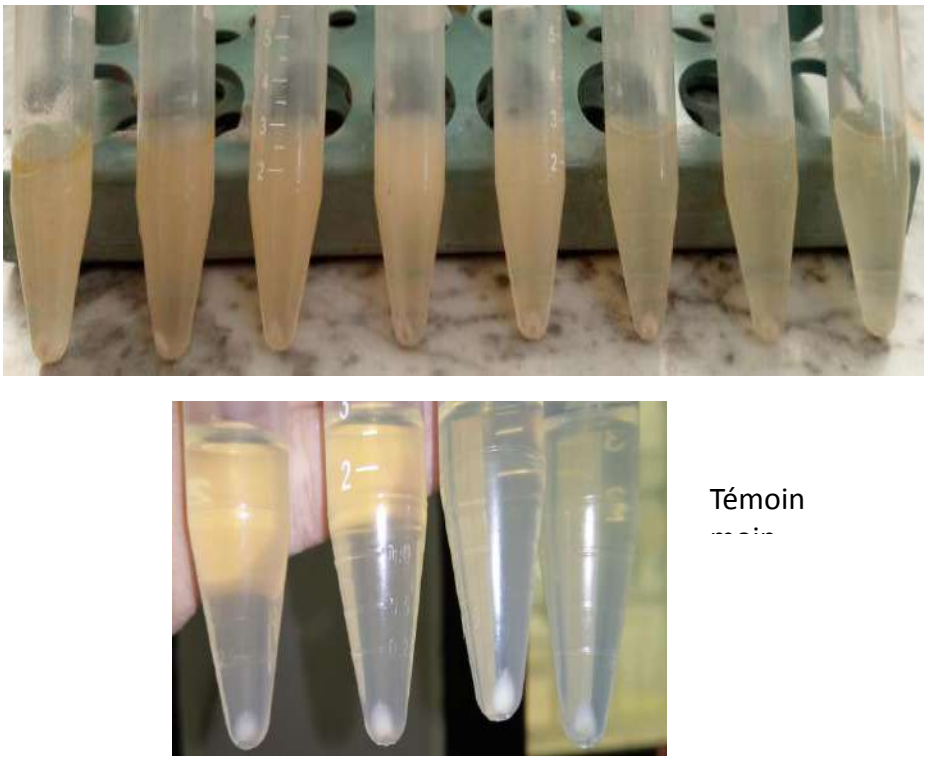


Figure IV.8: Evaluation de la CMI de l'HV de Nigelle cultivée vis-à-vis de *staphylococus aureus*(après centrifugation)

Les résultats d'évaluation de la CMI de HV testées par la technique de dilution (figure IV.3 et IV.4) nous a permis de tirer les points suivants :

- La valeur de la CMI de notre HV de nigelle cultivée nécessaire à l'inhibition de la croissance de ce germe (*staphylococus aureus*) est de 9,76 $.10^{-6}$ ml HV/ml (0.024%).
- La concentration minimale de HV de nigelle cultivée inhibitrice de la croissance de bactérie *streptocoque beta hémolytique*(CMI) est de 4,88 $.10^{-6}$ ml HV/ ml (0.012%).

Conclusion générale

Conclusion générale

La connaissance et l'usage des plantes médicinale constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâces aux thérapeutiques qu'elles procurent.

Le but de ce projet était de bien comprendre la notion de l'huile végétale et d'avoir une idée sur son extraction et sa composition. L'évaluation de la qualité de notre huile repose sur la détermination des caractères organoleptiques (consistance, couleur et odeur), la caractérisation physicochimique (densité relative, indice de réfraction, indice d'acide, indice de saponification et indice d'ester), ainsi que la détermination de l'activité antimicrobienne de celle-ci. Les résultats obtenus sont comparables avec ceux trouvés par Atta. Il ressort des déférentes investigations faite que :

- L'évaluation du caractère organoleptique d'huile végétale de nigelle cultivée présente une consistance liquide huileuse, une couleur jaune à brune et une odeur caractéristique de *nigella sativa L.*
- Les caractères physiques (indice de réfraction et la densité) présentent des résultats qui répondent aux normes.
- Par ailleurs indice d'acide et indice de saponification sont inférieures à ceux mentionnées par Atta, cela revient peut être à l'origine des graines et les conditions de culture.
- Le test microbiologique sur huile de nigelle cultivée ont montré une activité antimicrobienne sur les bactéries gram (+) (*streptocoque beta hémolytique et staphylococusaureus*), et aucun effet antibactérien sur les bactéries gram (-) (E.coli, *Klabsiella pneumoniae, enterobacter cloacae, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis* et *Klebseilla oxitocoque*).
- Les valeurs des CMI trouvées sont de 9,76 $.10^{-6}$ ml HV/ml et 4,88 $.10^{-6}$ ml HV/ ml pour *staphylococus aureus et streptocoque beta hémolytique,* respectivement.

Comme perspectives, on peut par la suite améliorer ce travail et le développer en étudiants les points suivant :

- Etudier l'effet bactérien sur d'autres bactéries gram (+) ainsi que la détermination de l'activité antifongique.

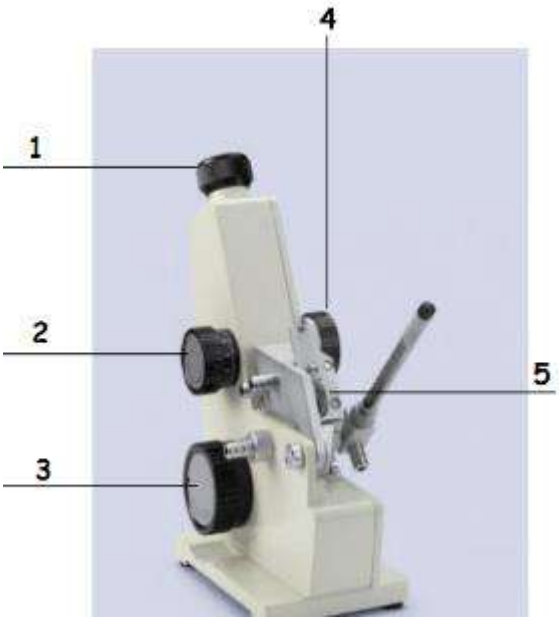
- Détermination de la composition exacte de notre l'huile végétale en utilisant la chromatographie en phase liquide HPLC
- Préparer des crèmes anti-inflammatoires à base de l'huile végétales de la nigelle cultivée
- Etudier d'autres activités pharmacologiques notamment l'activité antidiabétique, anticancéreuse et aussi l'activité antiallergique

Annexes

Principe de Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie IR est basée sur l'interaction de la lumière IR avec le nuage électronique des liaisons chimiques. Généralement, dans la majorité des spectroscopies optiques comme la spectroscopie de fluorescence, l'absorption d'énergie permet à un électron d'une liaison chimique de passe d'un état fondamental à un état excité. Dans le cas du spectroscope d'absorption IR, le rayonnement émis par la source polychromatique n'est généralement pas assez énergétique pour provoquer des transitions électroniques, mais il induit des transitions entre les niveaux d'énergies vibrationnelles. La transition vibrationnelle est également observée lors de la diffusion Raman qui est une spectroscopie de diffusion inélastique utilisant une radiation monochromatique (laser) pour exciter les électrons d'une liaison chimique. Lors de cette interaction il y a émission des radiations à des longueurs d'ondes différentes de celle de la radiation incidente.

Principe de réfractométrie



1. L'oculaire : permet de voir le champ visuel qui comprend à la fois le réticule et l'échelle d'indice de réfraction, et de faire la mise au point.

2. Bouton (dispersion): permet d'achromatiser pour obtenir une ligne de démarcation nette entre la zone éclairée et la zone sombre.

5. Couvercle d'ouverture de la fenêtre d'entrée de la lumière.

3. Bouton de mesure : permet de faire coïncider la ligne de démarcation entre la zone éclairée et la zone sombre avec la croisée des fils du réticule.

4. Bouton d'ouverture de l'emplacement des deux prismes.

- Ouvrir l'emplacement des deux prismes avec le bouton (4), nettoyer doucement les deux prismes avec du papier filtre imbibée d'une solution alcoolisée.
- Ouvrir la fenêtre (5) d'entrée de la lumière, la diriger vers une source de lumière (lampe).
- Déposer à l'aide d'un compte-gouttes une goutte du liquide sur le prisme P non rabattu. Rabattre doucement le prisme P' et fermer à l'aide du bouton (4)



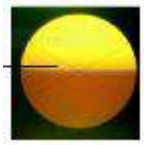
- Régler le bouton (3) de façon à observer dans l'oculaire (1) une zone de démarcation entre les deux zones sombre et claire.



- Tourner le bouton (2) jusqu'à observer à l'oculaire une ligne de démarcation nette entre les deux zones.



- Agir de nouveau sur le bouton (3) pour ramener la ligne de démarcation au centre de la mise.



- Effectuer la lecture de l'indice de réfraction en ajustant au besoin la mise au point de L'oculaire Lecture de l'indice du liquide déposé.



Ici n=1.3625

Préparation de la solution phénophtaléine

- Dissoudre 1g de phénophtaléine dans 100 ml d'éthanol.

Préparation de bouillon Mueller Hinton

- Suspendre 21g dans un 1 litre d'eau distillée.
- Chauffer jusqu'à la dissolution totale.
- Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

Références bibliographiques

[1]Duraffourd C.,Laprazj. C., Chemli R, « la plante médicinale de la tradition à la science », 1er congres Intercontinental TunisEd. Granche. Paris,(1997) 222.

[2]Ennadirj.,Hassikou R ., Bouazza F., Arahou M., Al Askari G.,Khedid K., **«** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et organiques des graines de *Nigellasativa L.* et de Foeniculumvulgar Mill ». Phytothérapie 12 (2014) 302-308

[3]Morin O., et PAGèS-XATART-PARèS, « huile et corps gras végétaux: ressource fonctionnelle et intérêt nutritionnel », OCL, 19 (2) (2012) 63-64.

[4]Jahouach W., « Décoloration des huiles végétales sur des argiles étude de la stabilité physicochimiques des huiles décolorées ». Mémoire pour obtention du diplôme d'études approfondies en chimie organique, 2002.

[5]Adams, R.P.,**"**Identification of essential oilcomponents by chromatography/ Quadruple mass spectroscopy" (2001). Alluredpuplishing corps. Carol stream (III, USA).

[6]BrissoG.J.,«Corps gras alimentaires et autres composés lipidiques : la signification des mots» (1982) Lipides et nutrition humaine. Ed : les presses de l'université laval, P 10-12.

[7]Guesnetr P. ; Alessandri J.M., Astorg P., ,PifferiF., LavialleAVIALLE M., « les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI) », OCL 12 (2005) 333-343.

[8]Rahmani M. , Saan A., Am J. Oil Chem. Soc., 75(1998)837-841,.

[9]Alais C., Lindeng, **«** lipides, vitamines in abrégé de biochimie alimentaire », (1997) Ed : Masson, Paris, pp 70-112.

[10]Kandji N., « étude de la composition chimique et de la qualité d'huile végétales artisanale consommés au Sénégal », Docteur en pharmacie université Cheik AntaDiop de Dakar, 2001, P 68.

[11]Dijkstra A., Segers J.,« Production and refining of oil and fats. Dans: *the lipid handbook with* CD-ROM", (2007)Third Edition.Eds Harwood, J. L., Gunstone, F. D., Dijkstra A. D., CRC Press, P 143-262.

[13]Natacha R., « Etude comparative de trois procédés d'extraction d'huile : aspects qualitatifs et quantitatifs : application aux graines de lin et aux pépins de raisin ». Thèse de doctorat : génie des procédés industriels et développement durable. Université de technologie compiègne, 2003, P 39-40.

[12]Gros C.,« Extraction aqueuse et athermique de l'huile de lin assistée par décharges électriques de haute tension », Thèse de doctorat, université de technologie de compiègne, France, 2005,P 244.

[14]Devillers PH, Thèbault J, Mathellier B, et al. 2010. Huiles végétales : guide d'aide à l'application des meilleures technologies disponibles –document électronique).

[15]Evard J, Pagès- Xatart- P ares X, Argenson C, Morin O.,« Procédés d'obtention et compositions nutritionnelles des huiles de tournesol », olive et colza. Cah.Nutr.Diét.42 :1S13-1S23.

[16]Deman W., "process for continuously deacidifying glyceride oils", U.S. Patent, 3(1968) 419-588,

[17]D.Ollivier, « Recherche d'adultération dans les huiles végétale : application à la qualité des huiles vierges et notamment de l'huile d'olive », O. C. L., 10(2003) 315-320.

[18]Fraisse A., « Les dioxines et les PCB type-dioxine dans les aliments gras ». OCL, 10 (2003)280-286.

[19]Pagès-Xatart-Parès, X.,**«** Technologies des corps gras (huile et graisses végétales) », Techniques de l'ingénieur(2008), dossier F6070, P 19.

[20]Johnson L.**, "**Recovery, refining, converting, and stabilizing edible fats and oil.Dans: Food lipids",EdsAkoh, C., Min, D., Marcel Dekker, New York, USA,**(**2002**)** 206-241.

[21]Ferreira-Diad S., Valente D. G., Abreu J., M.F.,"Comparison between ethanol and hexane for oil extraction from *Quercussuber L.* fruits",*Grasas y Aceites*, 54 (2003) 378-383.

[22]Wan P. J., Hron R. J., Dowd, M., Kuk S., Conkerton E. J.,"Isohexane as an alternative hydrocarbon solvent",*Oil Mill Gaz*, 100(1995) 28-32.

[23]Dunford N. T., "Utilization of supercritical fluid technology for oil and oilseed processing. Dans: Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing",EdtDunford N.T. and Dunford H.B., AOCS Publishing, Champain, Illinois, USA (2004) 100-116.

[24]Oxyde de carbone (8) – In : TESTUD F. Pathologie toxique en milieu de travail, 2^e éd. Edition ESKA, (1998) 83-91.

[25]Kirk-O., "Encyclopedia of chemical technology", 4^eéd. Vol.5. New York, John Wiley and Son, (1992) 35-53.

[26]FDA (2011) Alphabetical List of SCOGS (Select Committee on Gras Substance).https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/gras-substances-scogs-database (dernière consultation septembre 2020)

[27]Sovovà H., **"**Supertical fluid extraction from vegetable materials".Reviews in chemical Engineering, 27 (2011)79-156.

[28]De la production à la consommation France-Europe-Monde Statistique des oléagineux et plantes riches en protéines 2017.

[29]Chaabi M., **«** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales Afriquaines : EuphorpiaCunocla paille », Thèse de doctorat en pharmaco chimie, UniversitéLuis Pasteur et Mentouri ,Constantine, 2008.

[30]Ghedira K.,Le jeune R, « Huile de nigelle cultivée, *nigellasativa L.* », Phytothérapie, 8 (2010), 124-128.

[31]Meziti A., **«** Activité antioxydant des extraits des graines de *nigellasativa L.* étude in vivo et in vitro » Thèse de magistère. Département des sciences biologique. Université de El-hajlekhder (Batna) Algérie, 2009, P 15-20.

[32]Ghedira K.**, «** La nigella cultivée : *Nigellasativa L.* (ranunculaceae) », Phytothérapie 5 (2006) 220-226.

[33]Kokoska L.**, "**Chemistry and Biological Activity of nigella genus: the antimicrobial and anti-inflammatory effects of seed extracts, essential oils and compounds of six nigella species", Edition: LAPLAMBERT Academic publishing GmbH & Co. KG. U.S.A. P 1, 2011

[34]Ozenda P.,« les végétaux : organization et diversité biologique », 2 édition Dunod, Paris phytotherapyresearch. 17 (2000) 299-305.

[35]Mokkedem A.,« Guide pratique des cultures en secs de quelques plantes médicinales, condimentaires et aromatiques », (2004) INRAA, El-Harrach, P 10

[36]Teuscher E., Anton R., Lobstein A., « Plantes aromatique : épices aromates, condiments et huile essentielles ».(2005) Ed. Lavoisierr, Paris, P 552.

[37]Bousbia N.,« Extraction et identification de quelque huile essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin) :étude de leur activité antimicrobienne »,Thèse de magister en science alimentaires, (INA), El harrah, 2004,P 130.

[38]Benkaci-Ali F,**«** Etude de la composition chimique de la *nigelle sativa* originaire d'Algérie », Thèse de doctorat d'état en chimie organique appliquée, USTHB, 2007.

[39]Hegi G.Illustrierte Flora Von Mitteleuropa(1975), Volume III/3,2^{nd} Ed, Perey, Berlin.

[40]Zohary M.**,** "The genus Nigelle (ranunculaceae)- a taxonomic révision", Plant Systematic and Evolution 142 (1983)71-107

[41]Bonnier G., Douin R.,"La grandeflore en couleur", 1993, Tome 3 ; Ed Belin, Paris

[42]Iserin P.,**"**Encyclopedia of Médicinal Plants", (2001). 2^{nd} Ed. Darling Kindersiey Limited. P239.

[43]Bonnier G.,« La grande flore en couleur »,(1990) Ed Belin, Paris. Tome 1. P :17

[44]Ghedira K.,**«** La nigelle cultivée: *Nigellasativa L.* (Ranunculaceae) »,Phytothérapie 5 (2006)220-206.

[45]Nergiz C., Otles S.,"Chemical composition of nigella (*Nigella sativa L*) seed cultivated in Egypt and its lipid profile", Food chemistry, 1993, 83 : 63-68

[46]Takruri H.R.H., Dameh M.A.F., "Study of the nutritional value of black cumin seeds (*Nigella sativa L*)", journal of the science of Food and Agriculture, 76(1998) 404-401.

[47]Atta M .B.**, "**Some characteristics of nigella (*Nigella sativa L*) seed cultivated in Egypt and its lipid profile", Food chemistry, 83(2003)63-68

[48]Benkaci-Ali F., Baaliouamer A., Meklati B. Y., "Kinetic study of Microwave Extraction of Essential Oil of *Nigella sativa L*. seeds", Chromatographia, 64(2006) 227-231

[49]Burits M., Bucar F.,"Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil". Phytotherapy Research, 14(2000) 323-328

[50]Benkaci-Ali F., Baaliouamer A.,Meklati B.Y., chemat F.,"Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation". 2006. https://doi.org/10.1002/ffj.1773

[51]Ramadan M.F., Morsel J. T., "Direct isocratic normal-phase HPLC assay for fat soluble vitamins and β-carotene in oil seeds", European Food Research and Technology. 214 (2002) 521-527

[52]MerfortI., WarayV., Barakat H., Hussein S., NawwarM., WilluhnG., **"**Flavonoid triglycerides from seeds of *Nigella sativa",* Phytochemistry 46 (1997)359-363

[53]Bourgou, S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., FallehH., Marzouk B.,**"**Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa L.* shoots and roots", C. R. Biologies 331(2008) 48-55

[54]Greenish H., "Contribution to the chemistry of Nigella sativa", pharmacy J Trans (1880) vol.10.

[55]Ansari A., Osman S., Subbaram R.,"Component acids of minor seed oils", J Oil TechnolAssoc India 7(1975) 26-27

[56]Abdel-Aal, E., ATTIA, R., "Characterization of black cumin (*Nigella sativa*) seeds", Alexandria sci. Exch J , 14 (1993) 497-482

[57]Taskin M., Alankus-Caliskan O.,Anil H., Abou-Gazar H., A-Khan I., Bedir E., "Triterpènesaponins from Nigella sativa L.", Turkish j chem. 29(2005) 561-569

[58]Atta-UR-Rahman M., Cun-Heng H., Clardy J., "Isolation and structure determination of nigellicine, a novel alkaloid from the seeds of *Nigella sativa*.", Tetrahedron letters 23(1985) 2759-2762

[59]Atta-UR-Rahman M., Zaman K.,**"**Nigellimine : a new isoquinoline alkaloid from *Nigella sativa*", J Nat Prod 55(1992) 676-678

[60]Atta-UR-Rahman, M., Ahmed S., ChoudharyM., Habib-UR-Rahman, **"**Nigellimine- N-Oxide-a new isoquinoline alkaloid from the seeds of *Nigella sativa",* Heterocycles 23(1985) 953-955

[61]Atta-UR-Rahman M., Hassan S., Coudhary M. C., Clardy J.,**"**Nigellidine: a new indazolealcaloid from the seeds of *Nigella sativa",* Tetrahedron letters 36 (1995)1993-1996

[62]AL-Gaby A.,"Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* cake protein", Die Nahrung 42(1998)290-294

[63]Tuter M., Aksoy H., Ustan G., Riva S.,Secundo F., Ipekler S., "Partial purification of *Nigella sativa L*.Seed lipase and its application in hydrolytic reactions.Enrichment of γ-linolenic acid from borage oil", J Am chem. Soc., 2003

[64]AL Jassir, M.,"Chemical composition and microflora of black cumin (*Nigella sativa*) seeds growing in Saudi Arabia", Food chemistry 45(1992) 239-242.

[65]ArafaEl-S. A. , Zhu Q., Shah Z. I., Wani G., Barakat B. M., Racoma I., El-Mahdy M. A., Wani A. A.**"**Thymoquinone up-regulates PTEN expression and nduces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells",Mut Res, 706(1-2) (2011) 28-38

[66]AL-Saleh, I., Billedo G., EL-Doush I.,**"**Levels of selenium, DL-α-tecopherol, DL, γ-tocopherol, alltrans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa*seeds", J Food CompAnalysis 19 (2006) 167-175

[67]BenhaddouAndaloussi A., « Etude des proprieties antidiabétiques de *Nigellasativa L*: sites d'action cellulaires et moléculaires », Thèse de doctorat Université de Montréal, Département de pharmacologie, Montréal, 2009.

[68]Anton R., Teuscher E., Lobstein-Guth A., Bauermann U., Werner M., Rohrner C., et al.,**«** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiment et huiles essentielles », (2005) Paris : Médicales internationales

[69]Vonarburg B., Naturlich. 18(1998)65-68

[70]Sijelmassi A., **«** les plantes médicinales du Maroc », (1991) Le Fennec, casablanca

[71]Bellakhdar J.**,** « la pharmacopée marocaine traditionnelle, (1997)IbrisPress, Paris

[72] Maire A., Savelli A. **«** Insalah et le Tidikelt oriental, Etude historique, géographique et médicale », Arch. Inst Pasteur Alger 33(4) (1995) 367-432.

[73] Passager P., Barbancon S.,« Taghit (Sahara oranais) : étude historique, géographique et médicale », Arch. Inst. Pasteur Alger 34 (3) (1956) 404-475

[74] Passager P., Dorey R**.,«** El Golea (sahara algérois) : étude historique, géographique et médicale », Arch. Inst. Pasteur Alger 36(1) (1958)74-152

[75] Reboul E.,« le Gourara : étude historique, géographique et médicale »,Arch. Inst. Pasteur Alger 31(2) (1953)164-246

[76]Ramadan M.,Kroh L. R., Morsel J.,"Radical scavenging activity of black cumin (*nigella sativa L*), coriander (coriandrumsativum L), and niger (guizotiaabyssinnicacass) crude seed oils and oil fractions", J. agric. food chem., 51(2003) 6961-6969

[77]Houghton P.J., Zarka R., de lasHeras B., et al.,**"**Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation",Planta Med. 61(1995) 33-36

[78]Khan M., **"**Chemical composition and medicinal properties of *nigella sativa L.",* Inflammopharmacology, 7(1)(1999) 15-35.

[79]Agraval R; Kharya M.D.,Shrivastava R.,"Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa L.",* Indian J. Exp. Biol. 17 (1979) 1264-5

[80]Mahmoud M. R., EL-Abhar H.S; Saleh S.,"The effect of *nigella sativa* oil against the liver damage induced by schistosomamansonii mice", J. Ethno. parmacol. 79 (2002) 1-11.

[81]Abdel Fatah M., Matsumoto K., Watanabe H. "Antinociceptive effect of *Nigella sativa* oil and its major components in mice", Eur. J.Pharmacol.2000; 400 (2000) 89-97.

[82]Kanter M., Demir H., Karakaya C., OzbekH., "Gastro-protective activity of *Nigella sativa L*. oil and its constituent, thymoquinone against acute alcholinduced gastric mucosal injury in rat", *World J Gastroenterol*. 11(42) (2005) 6662-6.

[83]Zaoui A., Cherrah Y., Mahassini N., Alaoui K., Amarouch H., Hassar M.,"Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil", Phytomedicine, 9 (2002) 69-74

[84]Zaghlol D., Kamel E., Mohammed D., Abbas N., "The possible toxic effect of different doses of *Nigella sativa* oil on the histological structure of the liver and renal cortex of adult male albino rats", Egypt J.Histol. 35(1) (2012) 127-136.

[85]A.F.N.O.R Huile essentielles(2000),tome 1, Paris.Densité relative : NFT 75-111, Indice de réfraction : NFT 75-112, Indice d'acide : NFT 75-103, Indiced'ester : NFT 75-104

[86]Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C., Roura S.I., "Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic swiss chard", Lebensmittel-wissenschaft und technologie, 36 (2003) 679-684.

[87]Skandamis. P. N.,NychasG.J.E., "Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attribues of minced meat stored in air and modified atmospheres", Journal of applied microbiology, 91(2001) 1011-1022.

[88]Atta M. B.,"Somecharacteristics of nigella (Nigella sativa L.) seedcultivated in Egypt and itslipid profile", Food Chemistry 83 (2003) 63–68